



Høgskulen på Vestlandet

BIO160 Bacheloroppgave og Plakat Gruppe B - Bioingeniør

BIO160

Predefinert informasjon

Startdato:	24-03-2021 12:43	Termin:	2021 VÅR
Sluttdato:	26-03-2021 12:00	Vurderingsform:	Bestått/ikke bestått
Eksamensform:	Bacheloroppgave (skriftlig i gruppe)		
Flowkode:	203 BIO160 1 O 2021 VÅR		
Intern sensor:	Karl Albert Brokstad		

Deltaker

Naun:	Hanne Minda Vasstrand
Kandidatnr.:	244
HVL-id:	580681@hvl.no

Informasjon fra deltaker

Egenerklæring *: Ja
**Inneholder besvarelsen
konfidensielt
materiale?:** Nei
**Jeg bekrefter at jeg har
registrert
oppgavetittelen på
norsk og engelsk i
StudentWeb og vet at
denne vil stå på
vitnemålet mitt *:** Ja

Gruppe

Gruppenavn: B4
Gruppenummer: 4
**Andre medlemmer i
gruppen:** Vilde Evertsen, Anne Mari Mundal

Jeg godkjenner autalen om publisering av bacheloroppgaven min *

Ja

Er bacheloroppgaven skrevet som del av et større forskningsprosjekt ved HVL? *

Nei

Er bacheloroppgaven skrevet ved bedrift/virksomhet i næringsliv eller offentlig sektor? *

Ja, Helse Bergen



BACHELOROPPGAVE

Resistensbestemmelse av *Staphylococcus aureus*

Sammenligning av de fenotypiske metodene lappediffusjon og kløverbladtest mot den genotypiske metoden PCR, for resistensbestemmelse av *Staphylococcus aureus*.

Resistance determination of *Staphylococcus aureus*

Comparison of the phenotypic methods disk-diffusion and cloverleaf-test with the genotypic method PCR, for the determination of resistance in *Staphylococcus aureus*.

Vilde Evertsen, Anne Mari Mundal og Hanne Minda Vasstrand

Bioingeniørutdanningen

Fakultet for ingeniør- og naturvitenskap

Institutt for sikkerheit, kjemi- og bioingeniørfag

Intern veileder: Karl Albert Brokstad

26.03.2021

Jeg bekrefter at arbeidet er selvstendig utarbeidet, og at referanser/kildehenvisninger til alle kilder som er brukt i arbeidet er oppgitt, jf. Forskrift om studium og eksamen ved Høgskulen på Vestlandet, § 12-1.

Sammendrag

Staphylococcus aureus er en gram-positiv bakterie og en hyppig årsak til infeksjoner. Flere stammer av *S. aureus* har utviklet resistens mot ulike antibiotikum, inkludert benzylpenicillin (1). Det er derfor viktig at bakterien blir resistensbestemt før behandling iverksettes. De rutinemessige fenotypiske metodene for resistensbestemmelse på Haukeland Universitetssykehus, lappediffusjon og kløverbladtest, ble i denne studien sammenlignet mot den genotypiske metoden polymerasekjedereaksjon (PCR), som kan påvise det betalaktamaseproduserende *blaZ*-genet. Dette ble utført for å vurdere innførelse av PCR som resistensbestemmelsesmetode av *S.aureus*.

Studien ble utført med 158 ulike stammer av *S. aureus* som ble resistensbestemt mot benzylpenicillin ved bruk av alle tre metodene. Resultatene ble sammenlignet og brukt videre til å beregne sensitivitet og spesifisitet for de fenotypiske metodene. Sensitiviteten og spesifisiteten for lappediffusjon ble henholdsvis 98,6 % og 98,8 %, mens for kløverbladtesten ble begge verdiene beregnet til 100 %. Kløverblad kan derfor benyttes dersom lappediffusjon er ukonkluderende eller utfordrende å bedømme.

Konklusjonen ble derfor at begge de fenotypiske metodene er pålitelige metoder for resistensbestemmelse av *S. aureus*, og at det ikke er kritisk å innføre PCR. PCR kan derimot være en løsning dersom det haster at pasienten får svar på resistensbestemmelsen, ettersom kløverbladtesten vil kreve en ekstra dags ventetid.

Nøkkelord: *Staphylococcus aureus*, resistensbestemmelse, *blaZ*, fenotypiske tester, PCR

Abstract

Staphylococcus aureus is a gram-positive bacteria that frequently causes infections. Several strains of *S. aureus* have developed resistance towards antibiotics, including benzylpenicillin (1). It is therefore important to determine antibiotic resistance before treatment is initiated. The routinely used phenotypic methods for determining resistance, including the disk-diffusion and cloverleaf-test, were compared to the genotypic polymerase chain reaction (PCR), which detects the beta-lactamase producing *blaZ*-gene. This was performed to investigate if PCR should be implemented as the method for the determination of resistance in *S. aureus*.

In this study, we aimed to determine antibiotic resistance in 158 different strains of *S. aureus* with the utilization of these three methods. The results were compared and used to calculate the sensitivity and specificity of the phenotypic methods. The disk-diffusion's sensitivity and specificity were respectively 98,6 % and 98,8 %, whereas, for the cloverleaf-test, both values were calculated to be 100 %. The cloverleaf-test can therefore be used if the disk-diffusion is inconclusive or challenging to determine.

In conclusion, both phenotypic methods are reliable methods to determine antibiotic resistance in *S. aureus*. It is therefore not necessary to incorporate PCR in routine. PCR can regardless be a solution if the test-result is urgent to patient treatment, since the cloverleaf-test requires an extra day to complete.

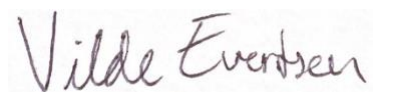
Keywords: *Staphylococcus aureus*, determination of resistance, *blaZ*, phenotypic tests, PCR.

Forord

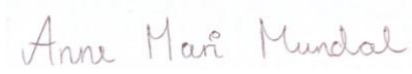
Denne bacheloroppgaven ble utført ved Mikrobiologisk avdeling på Haukeland Universitetssykehus. Studien tok sted ved Høgskulen på Vestlandet i perioden januar til mars 2021. Oppgaven gikk ut på å sammenligne fenotypiske tester mot en genotypisk metode for å resistensbestemme stammer av *Staphylococcus aureus*. Oppgaven har vært både lærerik, spennende og relevant, og vi er takknemlige for muligheten vi har fått til å gjennomføre studien på Haukeland Universitetssykehus med tanke på den pågående korona-pandemien.

Vi vil gjerne takke vår interne veileder Karl Albert Brokstad for godt samarbeid, hjelpsomme råd og for å ha delt sin kunnskap innenfor fagområdet med oss. Vi vil også takke våre eksterne veiledere på Haukeland Universitetssykehus: Helge Kolstad, Ann Kristin Haukenes og Paul Christoffer Lindemann. De har bidratt til instruering av benyttede metoder, tolkning av resultat, samt vært tilgjengelige for spørsmål ved behov. Gjennom denne perioden har de vært utrolig hjelpsomme og tilrettelagt for at denne studien skulle bli så vellykket som mulig. Vi er også takknemlige for at Mikrobiologisk avdeling på Haukeland Universitetssykehus disponerte laboratorium, utstyr og tid til denne studien.

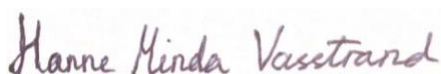
Bergen, 26.03.21



Vilde Evertsen



Anne Mari Mundal



Hanne Minda Vasstrand

Innhold

SAMMENDRAG	2
ABSTRACT	3
FORORD	4
1. INTRODUKSJON	7
2. TEORI	8
2.1 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	8
2.2 ANTIBIOTIKA – HISTORIE OG PENICILLIN	10
2.3 RESISTENSUTVIKLING.....	11
2.4 <i>BLAZ</i> -GENET	12
2.5 METODISK TEORI.....	13
2.5.1 <i>Skåler</i>	13
2.5.2 <i>Lappediffusjon</i>	14
2.5.3 <i>Kløverbladtest</i>	16
2.5.4 <i>BIOMIC</i>	17
2.5.5 <i>MALDI-TOF</i>	17
2.5.6 <i>DNA-ekstraksjon</i>	17
2.5.7 <i>PCR</i>	17
2.5.8 <i>Sensitivitet, spesifisitet og prediktiv verdi</i>	19
3. MATERIALE OG METODER	20
3.1 FORSKNINGSETIKK	20
3.2 PRØVEMATERIALE	20
3.3 UTSÅING.....	20
3.3.1 <i>Utstyr</i>	20
3.3.2 <i>Materiale</i>	20
3.3.3 <i>Metode</i>	21
3.4 LAPPEDIFFUSJON OG KLØVERBLADTEST	21
3.4.1 <i>Utstyr</i>	21
3.4.2 <i>Lappediffusjon</i>	23
3.4.3 <i>Kløverbladtest</i>	23
3.5 <i>BIOMIC</i>	24
3.5.1 <i>Utstyr</i>	24
3.5.2 <i>Metode</i>	24
3.6 <i>MALDI-TOF</i>	24
3.6.1 <i>Utstyr</i>	24
3.6.2 <i>Metode</i>	25
3.7 <i>DNA-EKSTRAKSJON</i>	25
3.7.1 <i>Utstyr</i>	25
3.7.2 <i>Metode</i>	26
3.8 <i>PCR</i>	26
3.8.1 <i>Utstyr</i>	26
3.8.2 <i>Metode</i>	27
3.8.3 <i>Beregninger for mastermik</i> s.....	28
3.9 STATISTIKK.....	29
3.9.1 <i>Beregning av sensitivitet for lappediffusjon</i> :.....	29

3.9.2 Beregning av spesifisitet for lappediffusjon:.....	29
3.9.3 Beregning av positiv prediktiv verdi for lappediffusjon:.....	29
3.9.4 Beregning av negativ prediktiv verdi for lappediffusjon:	29
3.9.5 Beregning av prosentavvik:.....	29
4. RESULTAT	30
4.1 UTSÅING.....	30
4.2 FENOTYPISK TESTING	30
4.2.1 Lappediffusjon.....	30
4.2.2 Kløverbladtest	33
4.3 GENOTYPISK TESTING - SANNTIDS-PCR	34
4.4 SAMMENLIGNING AV METODER	36
4.5 STATISTISKE SAMMENLIGNINGER	38
5. DISKUSJON	41
5.1 KONTROLL OG KVALITET.....	41
5.2 KONTAMINERING.....	42
5.3 AVLESNING AV FENOTYPISKE TESTER	42
5.4 PROSENTAVVIK.....	42
5.5 MANUELLE MÅLINGER MOT BIOMIC	43
5.6 LAPPEDIFFUSJON OG KLØVERBLAD	43
5.7 PCR MOT FENOTYPISK.....	45
5.8 SAMMENLIGNING MED FORSKNINGSLITTERATUR	46
5.9 FEILKILDER.....	46
6. KONKLUSJON	48
7. REFERANSER	49
8. APPENDIX.....	52

1. Introduksjon

Staphylococcus aureus er en klinisk relevant bakterieart som forårsaker en rekke ulike sykdommer, både lokale og systemiske infeksjoner, samtidig som bakterien har evne til resistensutvikling. Bakterien er utbredt i naturen; den finnes i både vann, jord, støv og luft, samt blant mennesker og dyr (2). Arten hører til menneskets normalflora på både hud og slimhinner, og er den bakterien som hyppigst forårsaker sykdom hos mennesker (3). Da spredning av resistens blant bakterier er en global problemstilling som kontinuerlig observeres og forskes på, er korrekte og spesifikke metoder for å påvise dette avgjørende. På Haukeland Universitetssykehus benyttes de fenotypiske testene lappediffusjon og kløverblad som rutine for resistensbestemmelse av *S. aureus*. Metodene er både enkle å utføre samt økonomisk fordelaktig. Tidligere forskning er utført innen feltet og har gitt varierende resultater ved sammenligning av sensitivitet og spesifisitet for fenotypiske tester mot den genotypiske metoden PCR. Flere studier viser til lave beregnede verdier for sensitivitet og spesifisitet for spesielt lappediffusjon (4;5), mens andre studier har vist til høyere verdier og dermed resultat som tilsier at lappediffusjon er en pålitelig metode (6;7). Kløverbladtesten er derimot ikke like mye evaluert, men det finnes studier som viser til variasjon i rapporterte resultater (4;5;7). Både lappediffusjon og kløverbladtest benyttes i kliniske laboratorier for å kunne resistensbestemme bakterier, og dermed til å vurdere hvilken antibiotika som bør benyttes i hvert enkelt tilfelle. Infeksjoner forårsaket av *S. aureus* kan behandles med benzylpenicillin, et antibiotikum som er effektivt mot ikke-betalaktamaseproduserende, gram-positive bakterier. Ved påvist resistens benyttes betalaktamasestabile antibiotika, som for eksempel kloksacillin (2). Korrekt medisinerer er avgjørende for optimal behandling av pasienter med infeksjon. Målet med denne studien er derfor å undersøke om de manuelle og fenotypiske metodene er tilstrekkelige for å kunne avgjøre om en bakterie er resistent mot benzylpenicillin eller ikke, eller om genotypisk metode, polymerasekjedereaksjon (PCR), bør innføres som rutine for undersøkelse av resistens.

2. Teori

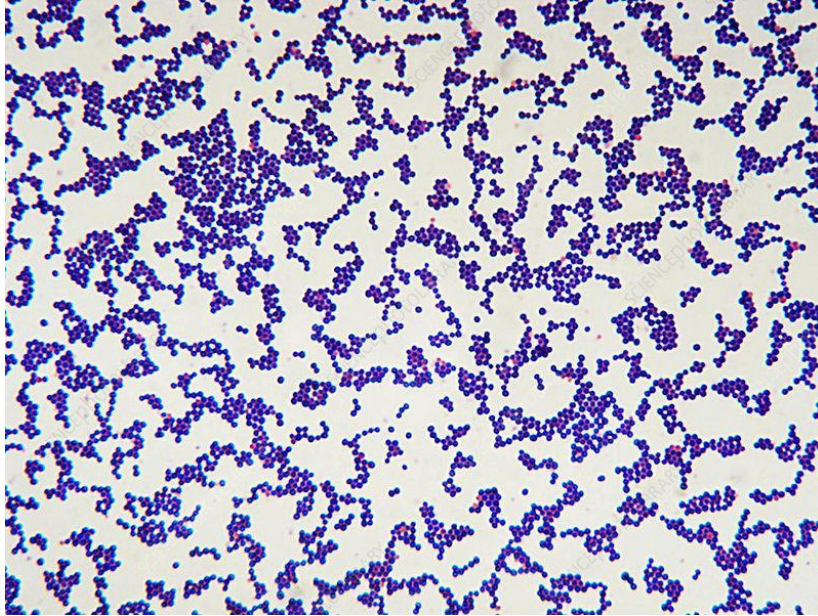
2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus er en av de viktigste og mest vanlige humane patogene bakteriene, og kan vanligvis isoleres fra opp til to tredjedeler av befolkningen. Den er hovedsakelig en kommensal bakterie, hvor den ikke medfører infeksjoner (8). Bakterien kan derimot erverve virulensfaktorer som gjør den potensielt patogen, hvor den kan medføre alvorlige lokale eller systemiske infeksjoner (2). Bakterien finnes ofte i fremre del av nesen, men kan også finnes i lyske, armhule, hals, rektum, vagina og perineum (8).

S. aureus er en gram-positiv bakterie med evne til å produsere et gult pigment, derav navnet «aureus». Dette kan gi koloniene et gulaktig utseende, og bakterien kalles derfor gule stafylokokker. Ved mindre lokale infeksjoner kan bakterien føre til dannelse av abscesser hvor det dannes gult, tykflytende puss. Dette er karakteristisk ved lokaliserte infeksjoner, som diverse hudinfeksjoner, brennkopper, øyeinfeksjoner og brystbetennelse.

Betennelsesreaksjoner er typisk karakterisert ved symptomer som rødme, økt temperatur, hevelse, smerte og nedsatt organfunksjon. Når blodgjennomstrømningen og gjennomtrengingen økes i kapillærene rundt det betente området vil forskjellige immunceller trenge inn i vevet. Fagocytter, som f.eks. makrofager og granulocytter, vil begynne å fagocyttere bakteriene og danne puss ved betennelsesstedet. *S. aureus* gir også ofte infeksjoner i skadet hud, brannsår og postoperative sår. Av den grunn er bakterien en sentral årsak til nosokomiale infeksjoner (sykehusinfeksjoner), som kan gi alvorlige systemiske symptomer som bakteriemi, sepsis, endokarditt, osteomyelitt og pneumoni om den ikke blir behandlet. Bakteriemi oppstår når bakteriene kommer inn i blodet, og kan resultere i sepsis med feber og sjokksymptomer hos pasienten. Når bakterien har spredd seg gjennom kroppen via lymfe og blodkar er det som regel en antibiotikakur som må til for å fjerne de livsfarlige infeksjonene (2).

I mikroskop opptrer stafylokokker som runde bakterier (kokker), som ofte befinner seg i klynger formet som drueklaser. Stafylokokker er lite kravstore og vokser aerobt eller fakultativt aerobt, som betyr at de hovedsakelig trives i en oksygenrik atmosfære, men kan også leve uten (9). Kjente laboratoriske faktorer er at de er koagulasepositive, katalasepositive, ofte hemolytiske på blodskål og kan spalte mannitol (2).



Figur 1. Gram-farging av *S.aureus* (10). Bildet viser den karakteristiske runde formen og den klyngete ansamlingen til bakterien.

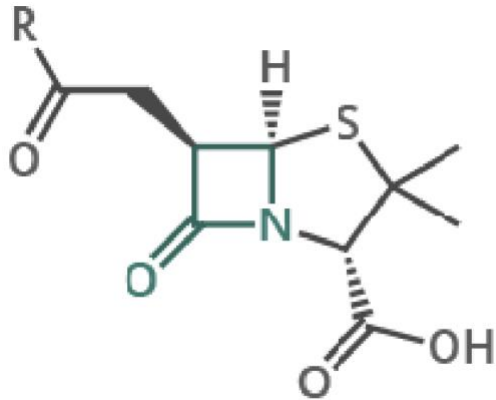
S. aureus har en rekke virulensfaktorer som er med på å fremkalle sykdom. Dette er blant annet enterotoksiner, eksotoksiner, biofilm og enzymer. Enzymet katalase vil kunne friggi oksygen fra hydrogenperoksid, mens enzymet koagulase vil medføre koagulering av plasma. Andre enzymer som gir bakterien virulens er hyaluronidase som bryter ned hyaluronsyre, som er viktig i bindevev, og dermed gjør stafylokokkene mer invasive. Stafylokinase løser opp koagler ved å aktivere plasminogen til plasmin som løser opp fibrin (11). Et annet enzym er lipaser. Disse hydrolyserer lipider, samt gir enzymet stafylokokker mulighet til å invadere subkutant vev. Cytolysiner ødelegger cellemembranene til de røde blodcellene og det er dette som gir stafylokokker den karakteristiske betahemolysen på blodskålen. Et eksempel på eksotoksin er leukocidin - et toksin med evne til å ødelegge hvite blodceller, som er med på å beskytte bakterien. Feber og andre alvorlige symptomer, som toksisk sjokk-syndrom, blir fremkalt av pyrogene eksotoksiner (eksotoksin A, B og C). Proteaser, kalt eksfoliatiner, bryter ned protein. Enterotoksiner kan fremkalle matforgiftninger. Disse finnes det minst 8 forskjellige av (2). I tillegg til en rekke virulensfaktorer har noen *S. aureus* stammer genet *blaZ*, som koder for enzymet betalaktamase, som spiller en viktig rolle i utvikling av antibiotikaresistens (4).

2.2 Antibiotika – historie og penicillin

Antibiotikarevolusjonen startet allerede i 1928, da Alexander Fleming ved et uhell oppdaget penicillin. Fleming observerte at en bakterieskål med *Staphylococcus aureus* hadde blitt kontaminert av en soppart, som igjen hadde hemmet vekst av bakterien. Dette var den første oppdagelsen av det antibakterielle midlet penicillin. Fleming påpekte at penicillin hadde klinisk potensiale og var et middel som kunne benyttes innen behandling for bakterieinfeksjoner (12).

Antibiotika kan lages ved hjelp av mikroorganismer (biosyntese), samt kan de produseres kjemisk (halvsyntetiske). Det antimikrobielle middelet er nødt til å kunne påvirke viktige funksjoner hos mikroorganismen for å ha noen effekt. Derfor må middelet påvirke funksjonen til ett eller flere målmolekyler hos mikroorganismen. Antibiotikumet kan blant annet påvirke cellemembranen, samt hemme celleveggsyntesen, proteinsyntesen, nukleinsyresyntesen og essensielle metabolske trinn i cellen. Flere antimikrobielle midler stopper eller hemmer mikroorganismens formering og vekst, uten at de drepes. Dette kalles *bakteriostatisk effekt*. Begrepet *baktericid effekt* benyttes når det antimikrobielle middelet dreper mikroorganismene (2).

Antibiotika kan deles inn i kategoriene smalspektret og bredspektret, basert på effekten de har på mikroorganismer. Smalspektret antibiotika har som regel effekt på en bestemt gruppe bakterier, som gram-positive eller gram-negative (13). Penicillin G, benzylpenicillin, er et eksempel på smalspektret penicillin som hovedsakelig har effekt på gram-positive bakterier. Penicilliner er en antibiotikaklasse som omfatter en større gruppe midler, som bygger på samme struktur. Disse midlene inneholder en ringstruktur, en betalaktamring, som har gitt midlene navnet betalaktamantibiotika (Figur 2). Denne antibiotikaklassen virker ved at den binder seg til penicillinbindende proteiner i cytoplasmamembranen hos bakterien. Disse proteinene er vesentlige enzymer for syntesen av molekyler i celleveggen, og når disse enzymene blir hemmet vil celleveggen ødelegges og cellen vil dø (2).



Figur 2. Betalaktamantibiotika med betalaktamring (grønn)(14).

Benzylpenicillin, eller penicillin G, er et smalspektret antibiotikum som først og fremst har effekt på gram-positive mikroorganismer, som inkluderer ikke-pencillinaseproduserende stafylokokker. Benzylpenicillin ødelegges av magesyren og må derfor gis intravenøst, eventuelt intramuskulært (2). Antibiotikumet destruerer bakterier ved hemming av syntesen av cellevegg. Dette medfører deformering av celleveggen og ødeleggelse av bakteriecellene (15). Et annet antibiotikum brukt i behandling av *S.aureus* er kloksacillin. Dette er et smalspektret, betalaktamasestabil antibiotikum, som benyttes ved behandling av betalaktamaseproduserende *S. aureus*. Antibiotikumet er relativt stabilt mot betalaktamaser fra gule stafylokokker, men brytes ned av betalaktamaser fra de fleste andre bakteriearter (16).

Bredspektret antibiotika er antibiotika som har effekt på både gram-positive og gram-negative bakterier. Det er som regel mest effektivt å benytte smalspektret antibiotika for å bekjempe spesifikke infeksjoner, slik at bakteriene blir drept og bivirkningene begrenses. Smalspektret antibiotika blir også hovedsakelig brukt for å redusere resistensutviklingen i bakterier (13). Bredspektret antibiotika kan være nyttig å bruke ved mangfoldig infeksjon, eller i noen tilfeller hvor bakterien som skaper infeksjonen er ukjent (2;13).

2.3 Resistensutvikling

Selv om noen bakterier er temmelig stabile i sin følsomhet overfor ulike antibakterielle midler, har andre økt evne til å utvikle resistens. Noen bakterier har lettere for å motstå antibiotikum ved å utvikle resistens, og noen midler fører raskere til resistensutvikling enn

andre. Ved økt bruk av et antibiotikum vil også seleksjonspresset øke, da resistente varianter får en fordel og derfor formerer seg raskere. Vanligvis skjer resistensutvikling over lengre tid, men det hender at det utvikles resistens i løpet av en behandlingsperiode, og at middelet derfor må byttes ut. I 1950-årene var det flere gule stafylokokker som ble penicillinresistente. Det dukket opp en ny form for resistens da det ble innført “stafylokokkpenicilliner”, og denne har nå spredd seg til mange land. Meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) er et begrep som brukes for å beskrive stafylokokker som er resistent mot penicillinet meticillin (2). MRSA oppstod bare to år etter introduksjonen av meticillin, når bakterien utviklet *mecA*-genet. MRSA er et økende problem som forårsaker alvorlige infeksjoner, lengre sykehusopphold og økt risiko for død (9). En årsak til resistens er at mål-molekylet til det antimikrobielle middelet endres. De penicillinbindende proteinene i cytoplasmamembranen kan endre seg slik at penicillinet ikke lenger bindes i samme grad. Når det penicillinbindende protein 2 (PBP2) endres til et modifisert protein (PBP2A) som følge av *mecA*, slik det skjer hos de meticillinresistente stafylokokkene, vil betalaktamantibiotika ikke lenger ha noen effekt (2). En annen årsak er at mikroorganismene kan produsere en rekke enzymer som modifiserer legemidlet slik at det ikke lenger fungerer. Mange av disse enzymene er kjent. Betalaktamaser er et eksempel på enzymer som hydrolyserer betalaktamringen i betalaktamantibiotika, slik at penicillin ikke lenger fungerer (4).

Noen bakterier har også evne til å overføre resistensmekanismer ved hjelp av transformasjon, konjugasjon og transduksjon. Transformasjon beskriver overføringen av gener fra en bakteriecelle til en annen. Slik overføring skjer ofte mellom nært beslektede celler. Konjugasjon er en overføring av DNA som skjer mellom to celler av forskjellig kjønn i direkte kontakt: en givercelle og en mottakercelle. Noen bakterier har såkalte sexpili, trådformete utløpere, som danner en kobling mellom bakterieceller hvor arvestoffet overføres. Transduksjon er en metode for overføring av DNA hvor et virus fungerer som bærer av arvematerialet. Slike virus kalles for bakteriofager, og infiserer mottakercellen for å overføre DNA (2). Overføring av DNA blant *S. aureus* skjer hovedsakelig gjennom konjugasjon og transduksjon (17).

2.4 *BlaZ*-genet

Det finnes mer enn hundre ulike betalaktamaser, og de som har størst effekt på penicillin kalles penicillinaser. Ca. 80 % av infeksjoner med *S. aureus* forårsakes av bakterier som

produserer enzymet penicillinase (2). Penicillinresistens i *S. aureus* forårsakes hovedsakelig av produksjon av betalaktamase, som kodes for av genet *blaZ* (18). *BlaZ*-genet kan enten befinne seg i genomet til bakterien eller i plasmidet (19). Genet er induserbart ved tilstrekkelig eksponering for penicillin, og trenger derfor muligens induksjon for å fremme betalaktamaseproduksjon (20). Penicillinase har evnen til å bryte ned betalaktamringen i benzylpenicillin, som er et smalspektret penicillinaseømfintlig middel. Derfor benyttes det penicillinastabile penicilliner, som dikloksacillin, meticillin og kloksacillin, ved infeksjoner forårsaket av resistente *S. aureus*. Det finnes derimot stafylokokkstammer som er resistente for også disse, blant annet MRSA (2).

2.5 Metodisk Teori

2.5.1 Skåler

For å kunne dyrke bakterier i et laboratorium er det nødvendig med næringsrike medier som promoterer vekst av mikroorganismer, samt selektive medier som gir gode vekstbetingelser for ulike grupper av bakterier. Ulike bakterier har ulike krav til næringsstoff. På laboratorier benyttes det derfor en rekke ulike medier, ettersom det undersøkes forskjellige bakterier. Et riktig utvalg av generelle og selektive medier benyttet på riktig måte, er en av hovedbetingelsene for å sikre god kvalitet på bakteriologisk diagnostikk (2). I denne studien ble det benyttet to typer skåler; blodagar til vekst av *S. aureus*, samt Müeller-Hinton agar til resistensbestemmelse.

Blodagar, eller blodskål, er et fast medium tilsatt 5-10 % blod. Blodet kan være både humant blod, saueblod eller av annen opprinnelse. De fleste patogene bakterier kan vokse på blodskåler, og de benyttes derfor hyppig som generelle medier til utsåing. Dette mediet er også det som best kan synliggjøre fremkalling av forskjellige typer hemolyse hos bakterier (2).



Figur 3. Blodagar. Benyttes for å isolere kliniske bakterier.

Müller-Hinton (MH) agar er et fast medium som benyttes til resistensbestemmelse. Mediet inneholder bovint ekstrakt og kasein hydrolysat for å tilføre nitrogen, vitaminer, karbon, aminosyrer og andre næringsstoffer som stimulerer vekst av mikroorganismer (21). I denne studien benyttes MH agar til både lappediffusjon og kløverbladtest.



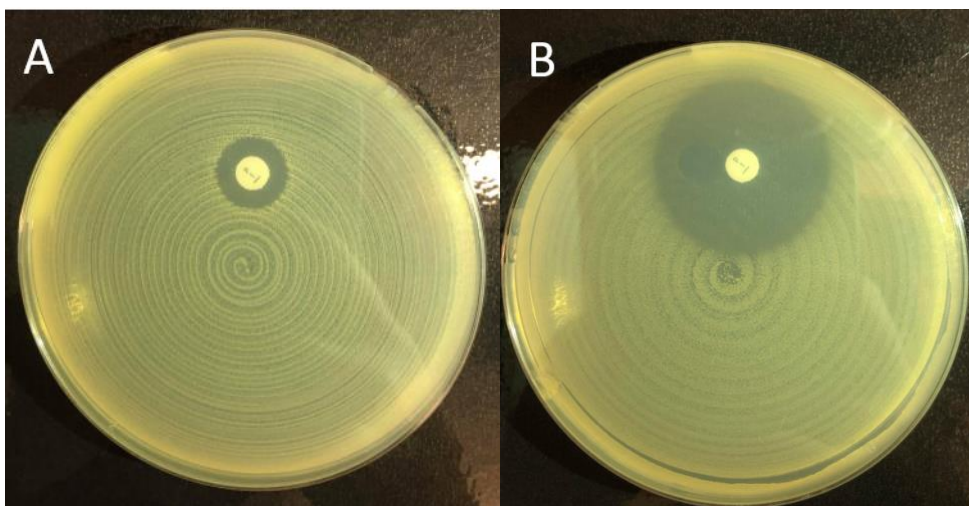
Figur 4. Müller-Hinton agar. Benyttes til resistensbestemmelse ved lappediffusjon og kløverbladtest.

2.5.2 Lappediffusjon

Lappediffusjon er en fenotypisk metode benyttet for å resistensbestemme bakterier ved mikrobiologiske avdelinger. I Norge og Europa brukes «European Committee on

Antimicrobial Susceptibility Testing» (EUCAST) som standardisert metode for å gi sammenlignbare resultater på tvers av laboratorier og land (22).

Ved lappediffusjon sås det ut et jevnt teppe av bakterier på skåler med MH agar. Noen bakterier må sås ut på Müller-Hinton Fastridious agar (tilsatt 5 % defibrinert hesteblood) på grunn av krav til vekstfaktorer (22). Resistensbestemmelse for *S. aureus* blir utført på MH agar, da bakterien har begrenset krav til vekstfaktorer. Ved resistensbestemmelse blir små filterpapirlapper som inneholder en definert mengde antibiotika, applisert på skålene med bakterier. Skålene plasseres deretter i en inkubator, hvor de inkuberes ved en bestemt tid med stabile standardiserte vekstbetingelser, som temperatur, aerobt/anaerobt, \pm CO₂. Antibiotika fra lappene vil under inkubering diffundere ut i agaren og skape en gradient med synkende konsentrasjon ut fra lappene. Bakteriene vil vokse på skålene, men stopper å vokse hvor minste hemmende konsentrasjon (MIC) er nådd. Dette vil skape en klar sone rundt lappene som er fri for vekst. Størrelsen på den klare sonen rundt lappene er målt i millimeter (mm) og vil, sammenlignet mot brytningspunktstabeller, kunne definere om bakteriene er følsom ved standard dose (S), følsom ved økt eksponering (I), eller resistente (R) mot antibiotikumet som befinner seg i lappene (23). Avlesning av sonestørrelsen rundt lappene (sonediameteren) kan gjøres automatisk, eller manuelt med linjal eller skyvelære.



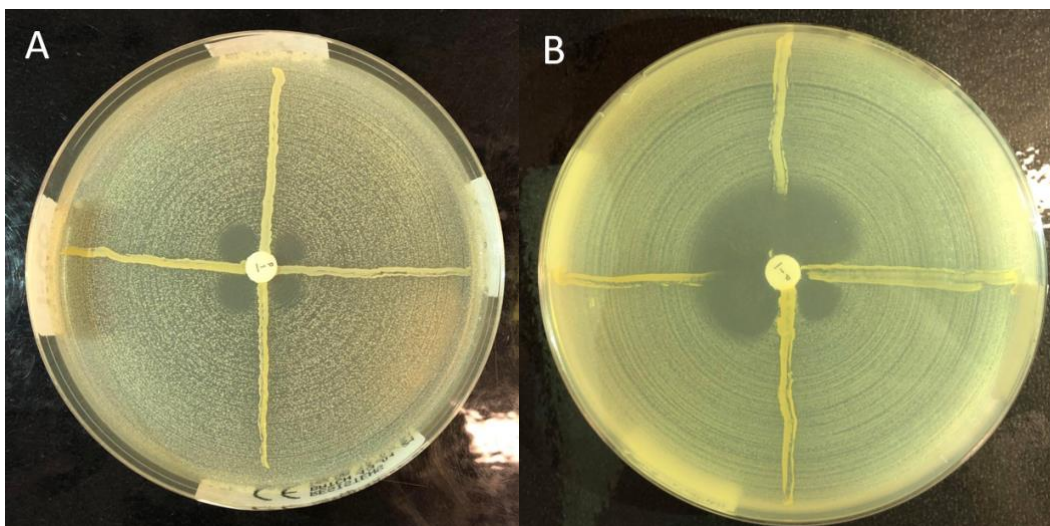
Figur 5. Lappediffusjon. (A) Lappediffusjon av en stamme med liten sonediameter (13 mm) og skarp sonekant. (B) Lappediffusjon av en stamme med stor sonediameter (33 mm) og diffus sonekant.

For lappediffusjon med benzylpenicillin til resistensbestemmelse av *S.aureus* vil det kliniske brytningspunktet for resistens være på mindre eller lik 25 mm. Dersom diameteren er målt til 26 mm eller over, er den sensitiv (23). Dette kommer da med ett unntak om diameteren er

større eller lik 26 mm, men har en skarp sonekant. Da vil den kvalifiseres som resistent. (24). Denne SIR-bestemmelsen anslås ved bruk av brytningspunkttabeller som er oppdatert årlig.

2.5.3 Kløverbladtest

Kløverbladtest er en metode som benyttes for å kunne påvise betalaktamaseproduksjon hos teststammer. Ved kløverbladtest benyttes en pencillinfølsom indikatorstamme og en ukjent teststamme. I denne studien benyttes indikatorstamme *S.aureus* ATCC 25923. Hver skål kan teste opp til fire test-/kontrollstammer. Etter at indikatorstammen er sådd ut over resistensskålen, avsettes teststammen fra midten av skålen og ut til siden. Deretter plasseres en benzylpenicillinlapp midt i skålen. Om teststammen produserer betalaktamase, vil det diffunderende penicillinet bli inaktivert av enzymet. Dette vil medføre at indikatorstammen kan vokse langs teststammen og inn mot penicillinlappen. Slik dannes det soner av veksthemming som vil danne et kløverbladmønster. Dersom teststammen ikke produserer betalaktamase, vil ikke penicillinet i skålen brytes ned. Da vil det oppstå en sirkulær hemningsone for indikatorstammen rundt penicillinlappen. Figur 6A viser eksempel på den karakteristiske kløverbladformen som dannes ved positive stammer. Kløverbladtesten behøver også kontrollstammer for å sikre kvalitet ved metoden. I denne studien benyttes *S.aureus* ATCC 29213 som positiv kontroll, og *S.aureus* ATCC 25923 som negativ kontroll (25).



Figur 6. Kløverbladtest. (A) Kløverbladtest med fire antibiotikaresistente stammer, da de tydelig har dannet den karakteristiske kløverbladformen. (B) Kløverbladtest med to antibiotikafølsomme og to antibiotikaresistente stammer. De to stammene som danner en rund sonekant langs indikatorstammen er antibiotikafølsomme.

2.5.4 BIOMIC

BIOMIC er et semi-automatisk instrument som måler sonediameteren på resistensskåler. Måling av sonediameteren kan også justeres manuelt etter behov. Ved måling på BIOMIC kan en også benytte ulike filter og forstørre bildet for å enklere kunne avgjøre hvor sonekanten starter/stopper. Henviser til Appendix for detaljert prosedyre for bruk av BIOMIC.

2.5.5 MALDI-TOF

MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight) er et instrument som benyttes til å bestemme arten til en bakterie ved hjelp av massespektrometri. Identifisering av mikroorganismer ved massespektrometri er basert på identifisering av et karakteristisk spektrum for en spesifikk art, som sammenstilles mot en større database i instrumentet. Metoden identifiserer og kvantifiserer molekyler ved å analysere masse-til-ladningsforhold (m/z) av molekylære ioner. Forholdet m/z vises som et kromatogram med topper spesifikke for en art (26).

2.5.6 DNA-ekstraksjon

Ved DNA-ekstraksjon blir bakteriekolonier samlet og blandet med revers osmose (RO)-vann, før de deretter blir satt på varmeblokk til koking. Kokingen gjennomføres for å bryte opp cellemembranen til bakterien, slik at DNAet frigjøres. Etter nedkjøling blir rørene sentrifugert slik at cellerester havner på bunnen, mens DNAet befinner seg løst i supernatanten. Supernatanten blir til slutt overført til nye rør. I tillegg lages det en blankprøve/negativ kontroll som blir tillaget og behandlet på samme måte, men som ikke inneholder bakterier eller DNA.

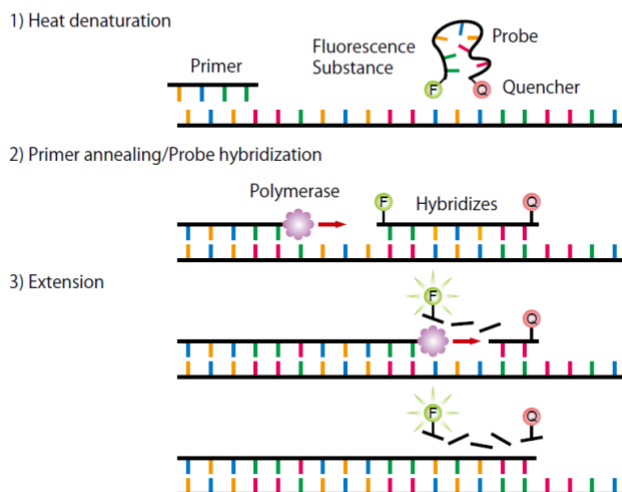
2.5.7 PCR

Polymerasekjedereaksjon (PCR) er en metode som benyttes for å syntetisere definerte DNA-sekvenser. Metoden fikk oppmerksomhet på 1980-tallet, da den amerikanske biokjemikeren Kary B. Mullis viste at metoden var mulig og løste en rekke praktiske hindringer for anvendelse av metoden. Fra den tid er metoden videreutviklet i form av både raskere reaksjoner, tilgjengelighet i rutinediagnostikk og såkalt "real-time PCR" som gjør det mulig å følge reaksjonen mens den pågår. I dag er PCR den mest benyttede amplifikasjonsmetoden for DNA (2). I det første trinnet av PCR vil instrumentet varme opp dobbeltrådet DNA til ca.

94-98 °C sammen med de fire deoksynukleotidene dATP, dCTP, dGTP og dTTP. Ved høy temperatur vil trådene i DNA-molekylet denatureres, og templatet blottes. Når temperaturen i hybridiseringstrinnet senkes til 40-65 °C kan tilsatte primere feste seg til deler av DNA-tråden som er komplementær til sekvensen som skal oppformeres. Til slutt vil en polymerisering skje ved at temperaturen heves igjen til 72 °C, og en varmestabil DNA-polymerase vil replikere DNA fra 3'-OH-enden av primerne med deoksynukleotidene. Deretter gjentas de tre trinnene med fordobling av DNA for hver syklus inntil ønsket mengde oppformert DNA er nådd (27).

Ved standard PCR undersøkes resultatene etter et bestemt antall sykluser ved avsluttet reaksjon. Sanntids-PCR er en metode som gjør det mulig å følge mangfoldigjøringen av ønsket DNA-sekvens samtidig som den termosykliske PCR-reaksjonen pågår. Teknikken blir benyttet i diagnostikk til både identifisering av bakterier, virus, genmodifiserte organismer og muterte alleler, og gjør det mulig å bestemme forekomst og mengde av en DNA-sekvens spesifikk for virus og bakterier (27).

I denne studien benyttes restriksjonsenzymet Premix Extaq HS (TaKaRa), som kjenner igjen og kutter det aktuelle området på DNA-tråden som skal amplifiseres. Primerne benyttet (Forward og Reverse) er spesifikke for *blaZ*-genet. Dersom dette genet finnes i DNAet til bakterien vil primerne binde seg til det enkeltrådede DNAet, og Taq-polymerasen kan replikere videre på primerne. Proben (TaqMan) som blir brukt er en DNA-sekvens som vil hybridisere på *blaZ*-genområdet, et sted mellom primerne. Proben har to ender, der 5'-enden består av den fluorescerende substansen FAM (Carboxy fluorescens) og 3'-enden av en såkalt quencer (Blackberry Quencer). Så lenge proben er intakt med begge endene, vil ikke den fluorescerende substansen avgi lys da den blir inhibert av quenceren. Når polymerasen bygger videre på primerne og støter på den hybridiserte proben vil denne bli ødelagt og den fluorescerende substansen vil kunne eksiteteres og dermed også emitte lys. Dette lyssignalet blir detektert av PCR-instrumentet ved ca. 500 nm. Etter hvert som PCR-syklusene fortsetter blir dette signalet sterkere om genområdet er tilstede i reaksjonen. Dersom DNAet ikke inneholder *blaZ*-genet vil proben alltid være intakt og det blir aldri avgitt lys (28).



Figur 7. Forløpet i PCR reaksjonen ved bruk av TaqMan probe. Trinn 1 viser DNA-denatureringen og innholdet i mastermiksen (probe med fluorescerende substans, quencher og primer). Trinn 2 viser hybridiseringen av proben og bindingen av primeren, i tillegg til polymerasen som fester seg til primeren. Trinn 3 viser DNA-syntesen (den videre replikasjonen som utføres av polymerasen), og at proben blir ødelagt slik at den fluorescerende substansen blir frigitt og kan avgi lyssignal (28).

2.5.8 Sensitivitet, spesifisitet og prediktiv verdi

Sensitivitet er et begrep som beskriver en metodes følsomhet for å fange opp sanne positive prøvesvar. Sannsynligheten for at en syk pasient får positivt svar på sin prøve, er altså metodens sensitivitet. Spesifisitet omfatter sannsynligheten for at en frisk pasient får riktig svar på sin prøve, altså en negativ test. En test med høy sensitivitet og lav spesifisitet vil altså med stor sannsynlighet kunne fange opp alle som er syke, men kunne gi noen falske positive svar hos friske mennesker. Sensitivitet og spesifisitet er begreper og beregninger som er interessante for å kvalitetskontrollere metoder, mens for hver enkelt pasient kan det være nyttig å undersøke prediktiv verdi (29).

Positiv og negativ prediktiv verdi kan forveksles med sensitivitet og spesifisitet, men er begreper som representerer andre verdier. Positiv prediktiv verdi er sannsynligheten for at en person med positivt testresultat faktisk er syk, mens negativ prediktiv verdi viser til sannsynligheten for at en person med negativt testresultat faktisk er frisk. En metode med høy sensitivitet kan ha lav positiv prediktiv verdi om testen utføres hos grupper med lav sykdomsprevalens. Prediktive verdier sier altså noe om testresultatet til en person er korrekt (29).

3. Materiale og Metoder

3.1 Forskningsetikk

Denne studien krevde ingen bruk av pasientopplysninger eller sensitiv informasjon og det var derfor ikke nødvendig med etisk godkjenning. Det bør derimot nevnes at selve studien tar opp et etisk dilemma: er det en sjanse til stede for at pasienter kan få tildelt feil antibiotika om de fenotypiske testene ikke er tilstrekkelige for å resistensbestemme bakterier?

3.2 Prøvemateriale

Tabell 1. Oversikt over kontroller og prøvemateriale benyttet i studien.

Materiale	Type
Betalaktamasepositiv kontrollstamme	ATCC 29213, <i>S. aureus</i>
Betalaktamasenegativ kontrollstamme	ATCC 25923, <i>S. aureus</i>
Prøvemateriale fra frysemedium	Kliniske isolater <i>S. aureus</i>

3.3 Utsåing

3.3.1 Utstyr

Tabell 2. Oversikt over utstyr benyttet ved utsåing.

Materiale	Type
Øser	10 µL (Sarstedt, Tyskland, REF: 86.1562.010)
Blodskåler	Haukeland Universitetssykehus, Produksjonslab
Stativ	Stort (42 prøver per stativ)
Inkubator	Termaks AS

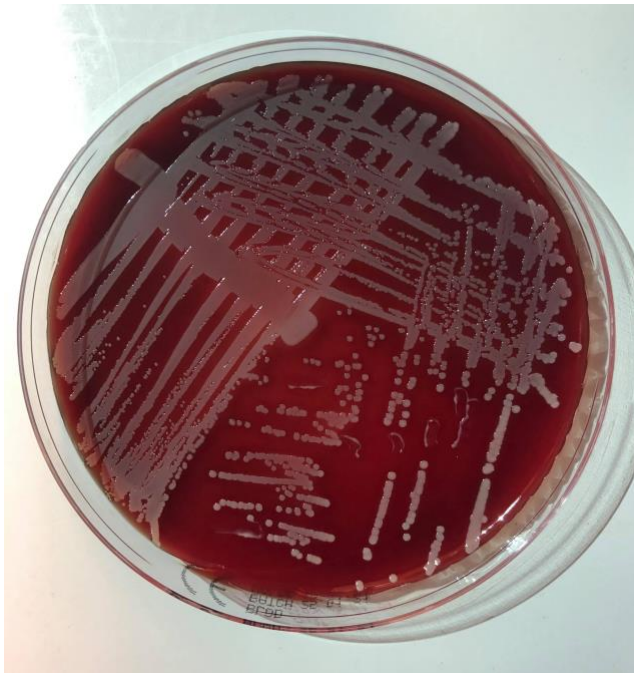
3.3.2 Materiale

158 ulike kliniske isolater av *S. aureus* ble oppslemmet og nedfrost ved Haukeland Universitetssykehus til bruk i studien. Isolatene ble innsamlet og resistensbestemt ved

Mikrobiologisk avdeling i løpet av november/desember 2020. Disse prøvene ble samlet fra sårprøver hos pasienter innlagt ved Haukeland Universitetssykehus og fra polikliniske pasienter.

3.3.3 Metode

For å kunne utføre resistensbestemmelse på de ulike stammene måtte bakteriene først sås ut på blodagar. Blå øse (10 µL) ble brukt for å overføre bakterier fra Greaves' frysemedium til blodagaren. Bakterieløsningen ble sådd ut på agaren ved fortynningsteknikk slik at det ble dannet individuelle kolonier.



Figur 8. Utsæd av en *S. aureus* stamme på blodskål ved bruk av fortynningsteknikk.

Fortynningsteknikken ble utført ved å føre øsen i rette bevegelser over $\frac{1}{3}$ av skålen, før skålen ble snudd 90 °C og det samme ble gjort med overlappende rette streker. Dette ble gjort tre ganger hvor man deretter sådde ut på det gjenværende område i en sikksakk bevegelse uten å berøre de rette linjene. Dette kan sikre vekst av enkeltkolonier og gode forhold for avlesning og videre bruk av bakterien. Etter utsåing ble skålene satt til inkubering ved 37 °C i et døgn. For hvert oppsett av utsåinger ble det sådd ut nye kontrollstammer.

3.4 Lappediffusjon og kløverbladtest

3.4.1 Utstyr

Tabell 3. Oversikt over utstyr brukt ved de fenotypiske testene lappediffusjon og kløverbladtest.

Materiale	Type
Nål til plassering av antibiotikalapper	20 gauge
Svabbepensler	150 mm (Medical Wire, Storbritannia)
Øser	10 µL (Sarstedt, Tyskland, REF: 86.1562.010) 1 µL (Sarstedt, Tyskland, REF: 86.1568.010)
Resistensskåler	Müller-Hinton agar (Haukeland Universitetssykehus, Produksjonslab)
Stativ	Lavt (15 prøver per stativ)
Inkubator	Termaks AS
Fysiologisk saltvann	Haukeland Universitetssykehus, Produksjonslab
Penicillinlapper	Thermo Fisher, Oxoid, England, REF: CT0152B #LOT: 3108156
Densicheck	Vitek, Biomerioux Inc, Italia, REF: M004120
Rotator	Montebello Diagnostics AS, Oslo, REF: N317657
Skyvelære	Thürmer, 150 mm
Vortex	Stuart, Bibby Sterlin Ltd, SA8, UK og VWR, labdancer S040, USA
Pasteurpipetter	Sarstedt AG&Co. KG, Tyskland, REF: 86.1172

3.4.2 Lappediffusjon

Etter inkubering ble bakteriestammer på blodskål brukt videre til resistensbestemmelse. Både resistensskålene, penicillinlappene og saltvann til oppslemming måtte oppnå romtemperatur før det ble benyttet. Resistensskål med fukt på lokket ble tørket før bruk, og eventuelt satt i inkubatoren med lokket av i 5-15 minutter. Utsædet fra blodskålene, både bakteriestammer og positiv kontroll (ATCC 29213), ble satt av på MH agar etter inkubering for å sikre ferske stammer. 5-10 kolonier fra hver stamme ble hentet opp fra blodskål og blandet med saltvann til en homogen løsning. Oppslemmingen av saltvann og bakterier til resistensbestemmelsen ble tillaget tilsvarende $0,50 \pm 0,05$ McFarland, som er et standardisert mål på tettheten til løsningen. Dette er innført for at avlesningen ikke skal påvirkes av mengden bakterier i løsningen. For å sikre dette ble Densicheck (Vitek) benyttet som måleinstrument. Det er også viktig at suspensjonen benyttes til resistensbestemmelse innen 15 minutter ifølge EUCAST's standardiserte metode (22). Suspensjonen av bakterier og saltvann ble jevnt fordelt utover resistensskåler ved hjelp av en rotator. Dette ble utført ved at en bomullspensel ble dyppet i suspensjonen og dratt forsiktig fra kanten til midten av skålen i en jevn bevegelse. Deretter ble skålene lappet med benzylpenicillinlapper (P1, Thermo Fisher Scientific) innen 15 minutter ved hjelp av nål. Lappene ble plassert med nål mellom kanten og midtpunktet av skålen slik at sonekanten får minst mulig interferens fra agaren. Lappede skåler ble innen 15 minutter satt til inkubering ved 35 ± 1 °C i vanlig atmosfære med bunnen opp. Skålene ble hentet ut fra inkubatoren etter 18 ± 2 timer til avlesning. For hvert oppsett ble det satt opp en kvalitetskontroll (*S. aureus* ATCC 29213) for å teste kvaliteten på antibiotikalappen og resten av systemet. Ved avlesning ble diameter av sonen rundt penicillinlappen målt ved hjelp av skyvelære. Diameteren ble avlest på skrått slik at eventuell interferens fra kanten av skålen og midten av skålen ikke påvirket resultatet. Sonediameteren ble målt ca. 30 cm fra øyet med en mørk bakgrunn og reflekterende lys. I tillegg ble sonekanten rundt lappen vurdert til skarp eller diffus ved hjelp av gjennomfallende lys. Det ble utført en avlesning per person, altså tre paralleller per isolat.

3.4.3 Kløverbladtest

NordicAST sin standardiserte metode ble brukt for tillaging av kløverbladtest (24). Noen kolonier fra indikatorstammen ATCC 25923 ble blandet ut i saltvann til optimal tetthet ($0,50 \pm 0,05$ McFarland) ved bruk av Densicheck. Deretter ble ATCC 25923 oppslemmingen sådd ut på resistensskål innen 15 minutter, slik som ved lappediffusjon, ved bruk av pensel og rotator. Kontroller og bakteriestammer ble sådd ut på skålen med en hvit øse (1 µL) fra senter

av skålen til kanten, 90 ° fra hverandre, uten at bakteriestammene rører hverandre i midten. En lapp med benzylpenicillin ble plassert i midten av skålen med en nål slik at lappen hadde kontakt med alle stammene, før skålen ble inkubert innen 15 minutter i 18 ± 2 timer ved 35 °C. Kontrollene og bakteriestammene ble vurdert som positive eller negative, alt etter om det ble dannet kløverblad-form eller ikke. For hvert oppsett av kløverbladtest ble det satt opp negativ og positiv kontroll.

3.5 BIOMIC

3.5.1 Utstyr

Tabell 4. Oversikt over utstyr brukt ved BIOMIC.

Materiale	Type
Semi-automatisk måleinstrument	BIOMIC V3 (Giles Scientific, USA)
Lofritt tørkepapir	VWR, USA, REF: 115-004

3.5.2 Metode

Etter manuell avlesning av lappediffusjon ble det utført en semi-automatisk avlesning av sonediameteren ved hjelp av instrumentet BIOMIC (Giles Scientific). I denne studien benyttes BIOMIC som en tilleggs metode for avlesning av sonediameter. Først ble eventuelt støv tørket av analyseskuffen med lofritt papir for å unngå forstyrrelser ved avlesning. Resistensskålen ble satt inn i skuffen på instrumentet og lest av automatisk på instrumentet. For hver bakterieprøve ble instrumentets automatiske måling av sonediameteren notert, samt gruppens manuelle justering av sonediameteren. Det er den korrigerte målingen som brukes videre i resultat, da det er denne som benyttes ved Haukeland Universitetssykehus. Detaljert prosedyre for analyse av bakterieskåler på BIOMIC kan finnes i Appendix.

3.6 MALDI-TOF

3.6.1 Utstyr

Tabell 5. Oversikt over utstyr brukt ved MALDI-TOF.

Materiale	Type
Target-plate	Bruker Daltonic GmbH, Tyskland, REF:

	1840375
Spiss trepinne	
Pipette	Eppendorf, Reference 2 (10 µL)
Matriks	Bruker Daltonic GmbH, Tyskland, REF: 0255344
MALDI-TOF instrument	Bruker Daltonic GmbH

3.6.2 Metode

Alle 158 stammene ble identifisert av Mikrobiologisk Avdeling ved Haukeland Universitetssykehus som *S. aureus* ved bruk av MALDI-TOF i forkant av studien.

MALDI-TOF ble ikke brukt kontinuerlig som metode gjennom studien for å bekrefte art på bakteriene, men som en kontroll for å undersøke blandingskultur. En liten og en stor koloni ble hentet opp fra skålen og sådd ut på ny i hver sin blodskål. Etter inkubering ble en koloni fra hver skål overført til en MALDI target-plate. Deretter ble mikrobene på platen dekket med 1 µL matriks-løsning. Mikrobene ble til slutt analysert på MALDI-TOF etter at matriksen hadde tørket inn.

3.7 DNA-ekstraksjon

3.7.1 Utstyr

Tabell 6. Oversikt over utstyr brukt ved DNA-ekstraksjon.

Materiale	Type
Eppendorfrør	Eppendorf, Tyskland, REF: 0030 123.328
Øser	1 µL (Sarstedt, Tyskland, REF: 86.1568.010)
Arkivrør	Sarstedt AG & Co. KG, Tyskland, REF: 72.694.006
RO-vann	Haukeland Universitetssykehus, Produksjonslab

Varmeblakk	Eppendorf, Thermomixer confort, Tyskland
Sentrifuge	Micro Star 17 (VWR, Tyskland, REF: 521-1646)
Pipette (100 μ L -1000 μ L)	FINNPIPETTE, Thermo electron corporation, REF: CH85700
Pipettespisser	VWR, USA, REF: 732-0534

3.7.2 Metode

5-10 kolonier fra bakteriestammene (Tabell 1) ble blandet med 500 μ L RO-vann i sine respektive eppendorfrør, før de ble satt 10 minutter på varmeblakk til koking ved 99 °C. Som negativ kontroll ble det brukt en blank med RO-vann og tom øse. Etter nedkjøling i romtemperatur ble rørene sentrifugert i 5 minutter ved 13 000 rpm. Deretter ble supernatanten overført til hvert sitt respektive arkivrør og nedfryst.

3.8 PCR

3.8.1 Utstyr

Tabell 7. Oversikt over utstyr brukt ved PCR.

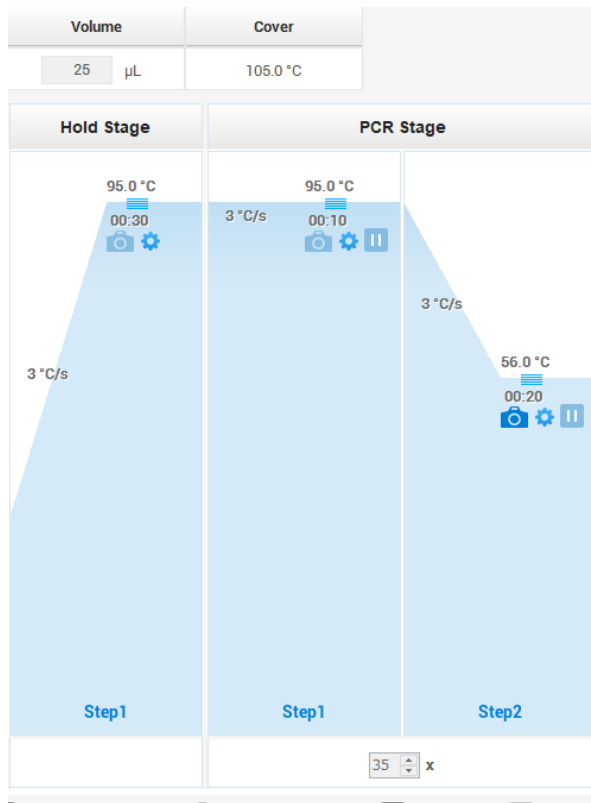
Materiale	Type
Pipetter (100 μ L - 1000 μ L)	FINNPIPETTE, Thermo electron corporation, REF: CH85700
Pipettespisser	VWR, USA, REF: 732-0534
Plastbelegg	LightCycler 480 Sealing foil (Roche, USA, REF: 04729757001)
PCR-plate	MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0.1 mL) (Applied Biosystems, China, REF: 4346906)
PCR-instrument	QuantStudio 5, Applied Biosystems,

	Thermo Fisher Scientific, REF: A28133
Arkivrør	Sarstedt AG & Co. KG, Tyskland, REF: 72.694.006
Premix Extaq HS (TaKaRa)	#LOT: AJ61909A #LOT: AJ12003A
F-primer	#LOT: 2066089 Sekvensnavn: blaZ-F2 GCTMATATTGGTGTYTATGC
R-primer	#LOT: 2066091 Sekvensnavn: blaZ-R2 GGAGAATAAGCAACTATATCATC
TaqMan probe	#LOT: 2066092 Sekvensnavn: blaZ-Pb 6FAM- AGAGATTTGCCTATGCTTCTACTTCA- BBQ
Vann	PCR-vann

3.8.2 Metode

Mastermiks til 61 prøver ble tillaget etter prosedyre (henviser til Appendix, supplementær tabell 1). 23 µL av tillaget mastermiks ble tilsatt 56 brønner på en 96-brønners plate. Før tilsetningen ble mastermiksen blandet og spunnet ned. Det ble laget Mastermiks til fem ekstra brønner for å være sikker på at det var tilstrekkelig mengde til alle brønnene. Deretter ble 2 µL av supernatanten til de tidligere nedfrysede bakterieprøvene og kontrollene tilsatt sine respektive brønner. Hver brønn inneholdt totalt 25 µL reaksjonsvolum etter tilsetting av mastermiks og templat. Alle prøvene og kontrollene ble blandet med vortex og spunnet ned før de ble tilsatt i brønnene. Mastermiks og templat ble tilsatt 96-brønners plater i tre omganger, med 56 prøver i to omganger og siste omgang med 55 prøver. Med på hvert oppsett var negativ kontroll/blankprøve og to positive kontroller; en med høy konsentrasjon og en med lav konsentrasjon av *S.aureus* ATCC 29213 (*blaZ*-positiv). 96-brønners platen ble til slutt tildekket med plast for å forhindre fordamping under PCR-reaksjonen. Før PCR-

analyse ble platen spunnet ned på sentrifuge (Fisherbrand) i 20 sekunder, før den ble satt i sanntids-PCR-instrumentet QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific). PCR-analysen ble gjennomført på følgende 2-trinns temperaturprofil i 35 sykluser: Ett trinn med enzymaktivering (95 °C i 30 sekunder), deretter denaturering (95 °C i 10 sekunder), og til slutt syntese (56 °C i 20 sekunder). Alle dataene ble innsamlet og brukt videre til sammenligning med de fenotypiske testene.



Figur 9. Forløpet ved PCR-analyse. Ved “Hold stage” ses oppvarmingsfasen. Her stiger temperaturen med 3 °C per sekund, til det nås 95 °C. DNAet vil denaturere i løpet av 30 sekunder. Syklusen går videre over til “PCR stage” i først 10 sekunder på 95 °C, hvor DNAet vil fortsette å denaturere. Deretter senkes temperaturen til 56 °C (synker 3 °C per sekund) i 20 sekunder. Her vil hybridiseringen av primerne og DNA-syntesen skje.

3.8.3 Beregninger for mastermiks

Henviser til Appendix, Supplementær tabell 1 for mastermiks oppskrift tilegnet en prøve. Da pipettene ikke kunne innstilles til desimaltall ble mengden avrundet til nærmeste hele tall.

- **Formel 1:** (Mengde reagens for en prøve) x 61 = mengde reagens i mastermiks

Eksempel (Premix Extaq HS - TaKaRa): 12,5 µL x 61 = 762,5 µL

3.9 Statistikk

Etter at bakteriestammene var undersøkt ved hjelp av både fenotypiske og genotypiske undersøkelser, ble det utført beregninger på innsamlede data for å kunne sammenligne resultatene. Sensitivitet og spesifisitet for kløverbladtesten og lappediffusjon ble beregnet mot “gullstandard” PCR. En gullstandard er en pålitelig metode som studiens metoder kan måles opp mot for å utføre statistiske beregninger. I tillegg til sensitivitet og spesifisitet ble det utført beregninger for positiv og negativ prediktiv verdi.

3.9.1 Beregning av sensitivitet for lappediffusjon:

- **Formel 2:** $\frac{\text{Sanne positive på lappediffusjon}}{\text{totalt antall positive på PCR}} * 100 \%$

Eksempel: $\frac{72}{73} * 100 \% = 98,6 \%$

3.9.2 Beregning av spesifisitet for lappediffusjon:

- **Formel 3:** $\frac{\text{Sanne negative på lappediffusjon}}{\text{totalt antall negative på PCR}} * 100 \%$

Eksempel: $\frac{84}{85} * 100 \% = 98,8 \%$

3.9.3 Beregning av positiv prediktiv verdi for lappediffusjon:

- **Formel 4:** $\frac{\text{Sensitivitet} * \text{Prevalens}}{\text{Sensitivitet} * \text{Prevalens} + (1 - \text{Spesifisitet}) * (1 - \text{Prevalens})}$

Eksempel: $\frac{0,986 * 0,462}{0,986 * 0,462 + (1 - 0,988) * (1 - 0,462)} = 0,986 \approx 98,6 \%$

3.9.4 Beregning av negativ prediktiv verdi for lappediffusjon:

- **Formel 5:** $\frac{\text{Sensitivitet} * (1 - \text{Prevalens})}{(1 - \text{Sensitivitet}) * \text{Prevalens} + \text{Spesifisitet} * (1 - \text{Prevalens})}$

Eksempel: $\frac{0,988 * (1 - 0,462)}{(1 - 0,988) * 0,462 + 0,988 * (1 - 0,462)} = 0,989 \approx 98,9 \%$

3.9.5 Beregning av prosentavvik:

- **Formel 6:** $\frac{\text{Største verdi} - \text{Minste verdi}}{\text{Minste verdi}} * 100 \%$

Eksempel (prøve 1-4): $\frac{18 - 17}{17} * 100 \% = 5,9 \%$

4. Resultat

I denne studien ble totalt 158 stammer sådd ut og undersøkt for benzylpenicillinresistens ved lappediffusjon, kløverbladtest og sanntids-PCR. Fenotypiske tester, lappediffusjon og kløverbladtest, ble utført først, før det ble hentet ut resultat fra den genotypiske metoden PCR. Tidsperioden for innhenting av resultat for alle metoder omfattet ca. fire uker. Prøvene som er testet her er selekterte og representerer ikke gjennomsnittlig fordeling av resistens i et normalt sett med prøver. Henviser til Appendix for alle resultat og rådata fra fenotypiske tester og genotypisk metode.

4.1 Utsåing

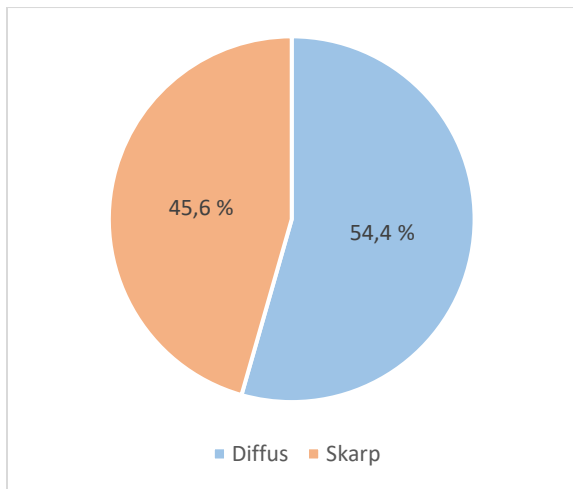
Utsåingen av alle bakterieprøver og kontroller var problemfri med unntak av ett tilfelle. Alle blodskåler inneholdt vekst, med variert kvalitet på enkeltkolonier/fortynning. Figur 8 viser et eksempel på en blodskål med vekst etter inkubering i ett døgn. For å undersøke en bakterieskål med unormal vekst, ble MALDI-TOF benyttet for å bestemme arten av bakterien. Skålen inneholdt kolonier av ulik størrelse, og en mistenkte derfor kontaminering. Etter analysering på MALDI-TOF viste det seg at en gram-negativ bakterie hadde forurenset utsædet og gitt feilaktig resultat. Da prøven ble sådd ut på nytt viste blodskålen forventet vekst og resultat.

4.2 Fenotypisk testing

På Haukeland Universitetssykehus benyttes lappediffusjon som rutineundersøkelse for å resistensbestemme spesifikke bakterieprøver. Kløverbladtesten benyttes som en kontrollundersøkelse om resultatet fra lappediffusjon blir vurdert som følsom, er utydelig eller utfordrende å vurdere. I denne studien ble lappediffusjon og kløverbladtest utført på alle stammer for å kunne sammenligne metodene med hverandre, og mot den genotypiske metoden sanntids-PCR.

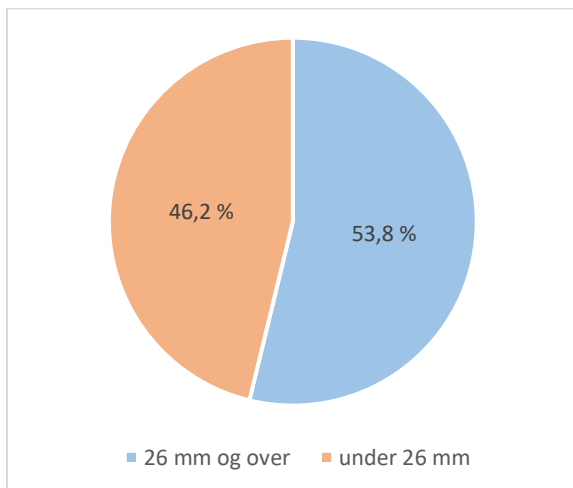
4.2.1 Lappediffusjon

For lappediffusjon ble både sonediameteren og sonekanten vurdert. Disse ble sammenlignet med hverandre, men også med målingen gjort på BIOMIC.



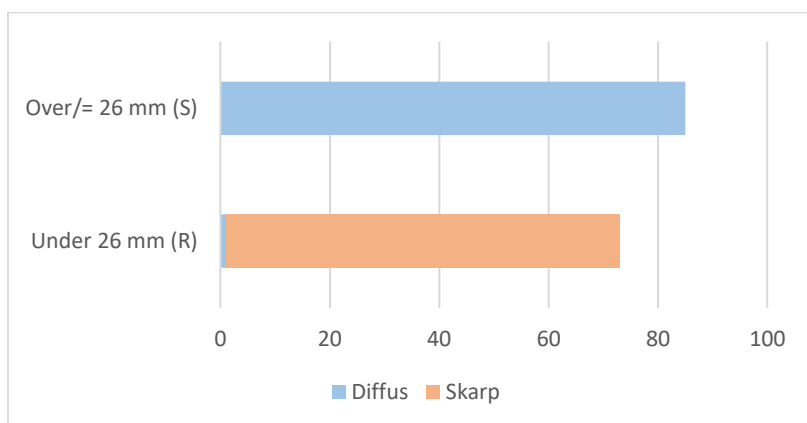
Figur 10. Forhold mellom skarp og diffus sonekant. Prosentvis andel av skarpe og diffuse sonekanter blant de 158 bakteriestammene ved lappediffusjon. Den blå delen representerer diffuse sonekanter, mens den oransje representerer de skarpe.

Fra utførelsen av lappediffusjon ble 86 stammer vurdert til å ha diffus sonekant og 72 stammer vurdert til skarp sonekant. Figur 10 illustrerer forholdet i prosent mellom målte diffus og skarpe sonekanter av de 158 *S. aureus* stammene. Hvert oppsett av lappediffusjon inneholdt en positiv kontroll, som for hvert oppsett var innenfor referanseområdet 12-18 mm.



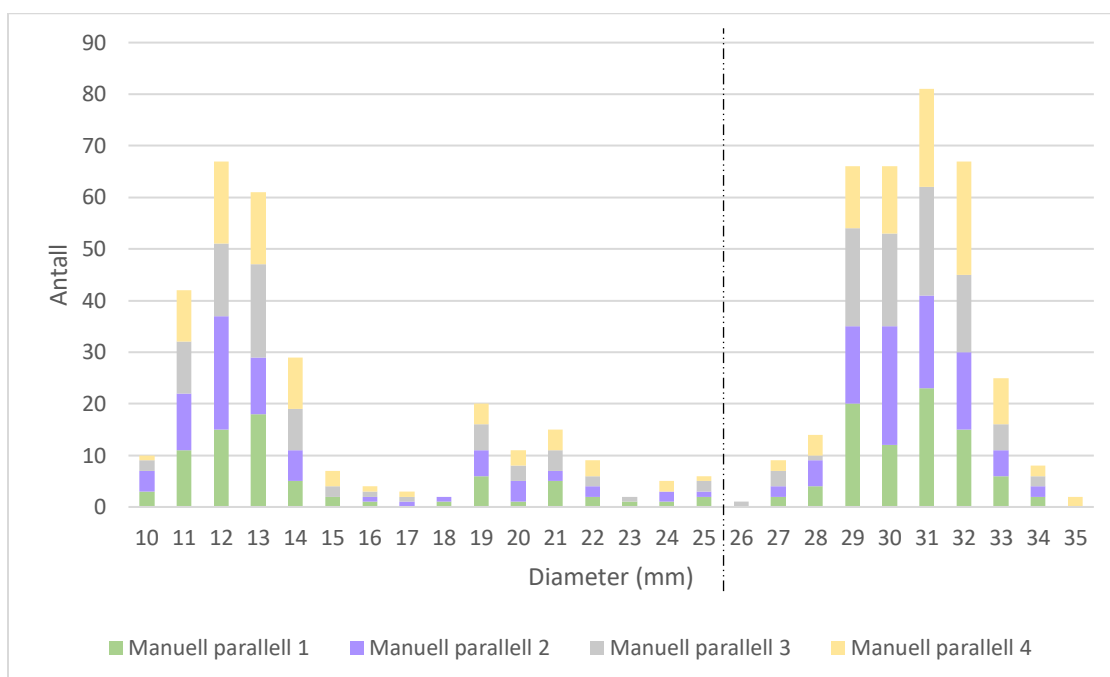
Figur 11. Forholdet mellom målte sonediametre ved det kliniske brytningspunktet. Andel bakteriestammer etter 632 målinger (manuelle målinger og BIOMIC) med diameter over og under den kliniske brytningsverdien 26 mm. Den oransje delen representerer stammer med sonediameter under 26 mm og den blå representerer stammer over 26 mm.

Bakterienes sonediameter ved lappediffusjon ble målt i tre manuelle målinger og en måling på BIOMIC. Fra dette ble det 632 separate målinger hvor 54 % ble målt til 26 mm eller over, og 46 % ble målt til under 26 mm som representert i Figur 11.



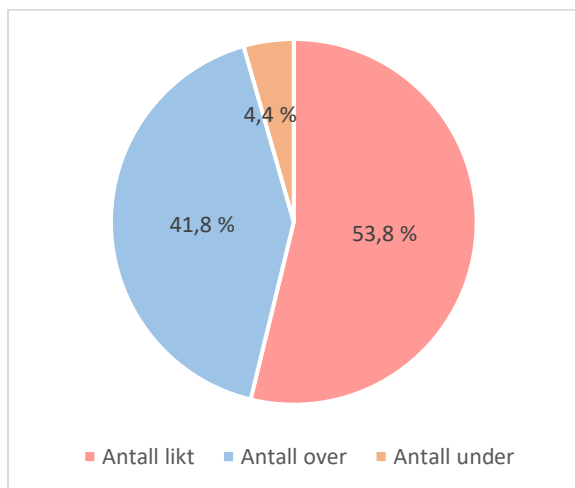
Figur 12. Antall diffuse/skarpe sonekanter under og over det kliniske brytningspunktet. Sammenligning av antall skarpe/diffuse sonekanter som ligger under 26 mm, og over eller lik 26 mm. Den øverste stolpen representerer antall over eller lik 26 mm, mens den nederste stolpen representerer antall stammer med sonediameter under 26 mm. Fargen blå er stammene som har diffus sonekant, og oransje er stammene med skarp sonekant.

Figur 12 viser antall diffus/skarp mot antall diameterer målt over/lik eller under brytningspunktet. Stolpediagrammet viser at alle stammene som har målt diameter på 26 mm eller over var diffuse. Ved stammene under 26 mm derimot ses det at en av stammene er diffus, mens resten har skarpe sonekanter.



Figur 13. Antall målte diameterer ved lappediffusjon. x-aksen er diameteren i mm til bakteriestammene ved lappediffusjon og y-aksen er antallet bakteriestammer. Fargene i hver stolpe viser til manuell parallell 1, 2, 3 og målingen på BIOMIC. Den stiplede linjen representerer det kliniske brytningspunktet.

Det ble utført tre manuelle parallelle målinger av alle resistensskålene, samt en felles måling ved bruk av BIOMIC. Rådata til alle målingene finner man i Appendix, supplementær tabell 2. Dette ser man illustrert i Figur 13. Her kan man se en antydning til to normalfordelinger på hver sin ende.

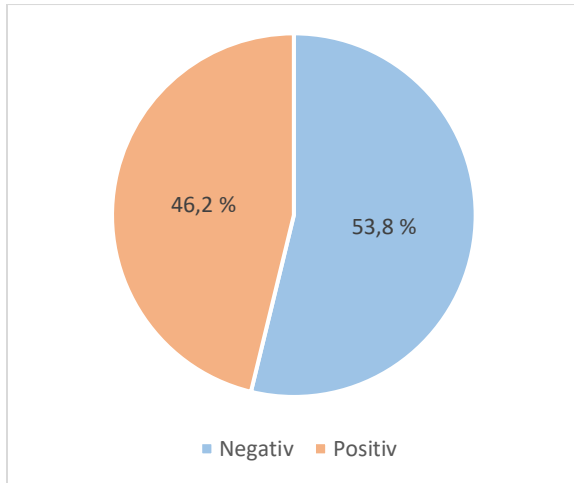


Figur 14. Lappediffusjon sonediameter måling; gjennomsnittlig manuell måling sammenlignet med BIOMIC måling. Den røde andelen representerer antall stammer som ble målt til samme sonediameter, både for manuell gjennomsnitt og for BIOMIC. Den blå andelen representerer antall stammer med sonediameter målt som større på BIOMIC enn det manuelle gjennomsnittet. Den oransje andelen representerer antall stammer med sonediameter målt som mindre på BIOMIC enn det manuelle gjennomsnittet.

I denne studien skulle det hovedsakelig fokuseres på de manuelle avlesningene. Da BIOMIC er metoden Haukeland Universitetssykehus benytter i rutine for måling av sonediameter ved lappediffusjon, var det interessant å se på hvordan denne metoden ligger i forhold til de manuelle avlesningene som ble gjort. Presentert i Figur 14 ser man hvordan den korrigerede målingen gjort ved BIOMIC har ligget likt, over eller under i forhold til de manuelle parallellenes gjennomsnittlige målte sonediameter. BIOMIC har hovedsakelig ligget likt ved 53,8 % av målingene og over i 41,8 %. Denne metoden målte sjeldent en verdi under den manuelle avlesningen og var bare lavere i 4,4 % av målingene.

4.2.2 Kløverbladtest

Parallelt med utførelsen av lappediffusjon, ble kløverbladtest satt opp for alle bakterieprøver. Disse ble vurdert enten positive eller negative for betalaktamaseproduksjon.

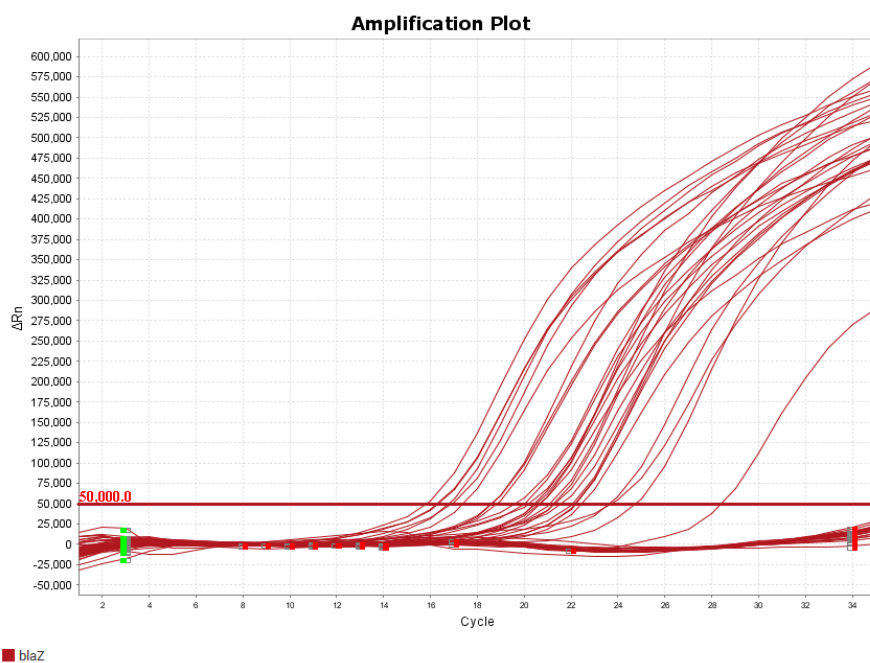


Figur 15. Forholdet mellom betalaktamasenegative og -positive stammer ved kløverbladtest. Andelen av positive og negative stammer etter gjennomført kløverbladtest er fordelt i diagrammet over. Den blå delen representerer andel bakteriestammer som testet negativt på kløverbladtesten, og dermed ikke produserer betalaktamase, mens den oransje delen representerer positive bakteriestammer som produserer betalaktamase.

Figur 15 illustrerer andelen stammer som gav negativt og positivt utslag på kløverbladtesten. 53,8 % av de 158 stammene var negative for betalaktamaseproduksjon, mens 46,2 % av stammene var positive.

4.3 Genotypisk testing - sanntids-PCR

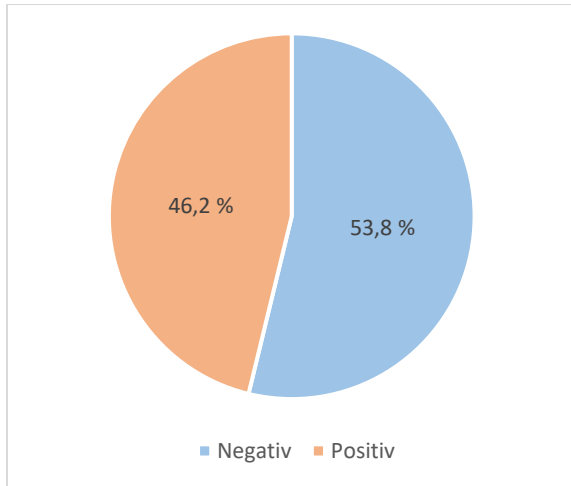
Etter utførelse og innhenting av resultat fra fenotypiske tester ble alle bakterieprøver, inkludert kontroller, analysert ved hjelp av den genotypiske metoden sanntids-PCR. Alle resultatene fra sanntids-PCR-analysen ble overført til PC. Her ble PCR-reaksjonen visuelt i form av flere grafer. Resultatene ble konkludert som enten positiv eller negativ for *blaZ*-genet.



Figur 16. Resultater fra sanntids-PCR-analysering av oppsett 1. x-aksen viser antall sykluser, mens y-aksen viser amplifisert mengde av genen *blaZ*. Dersom en stamme inneholder genen *blaZ* vil mengden *blaZ* øke ved antall sykluser, ettersom genen blir amplifisert, og det dannes en kurve. Dersom stammen ikke inneholder genen *blaZ* vil grafen være flat. Threshold verdi ble satt til 50 000 ΔRn. Oppsett 1 inneholdt prøve 1-1 til 1-53.

Figur 16 viser hvordan økning i fluorescens utvikler seg i forskjellige prøver under sanntids-PCR. Tidlig økning (i henhold til sykluser) indikerer høyere konsentrasjon av målgenet. Ettersom bakterieprøvene ble kjørt i tre oppsett, ble det totalt tre plot (Se Appendix, Supplementær figur 1 og 2, for resten av oppsettene). Ca. 50 bakteriestammer ble analysert for hvert oppsett. Stammene som fikk en graf med kurve inneholdt *blaZ*-genet, mens stammene med flat graf inneholdt det ikke.

Etter at alle de tre oppsettene ble analysert ved sanntids-PCR, ble resultatene herfra sammenlignet med resultatene fra de fenotypiske testene. Da viste det seg at to av stammene avvirket i forhold til resultatene fra de fenotypiske testene versus resultatet fra sanntids-PCR. Dette gjaldt stamme 1-58 og 1-82. Stamme 1-58 fikk sonediameteren målt til 13 mm med skarp sonkant for lappediffusjon, ble positiv på kløverbladtesten, men ble negativ for *blaZ*-genet på sanntids-PCR. Stamme 1-82 fikk sonediameteren målt til 25 mm med skarp sonkant, ble positiv på kløverbladtesten, men ble også negativ for *blaZ*-genet på sanntids-PCR. Det ble dermed bestemt at disse stammene først skulle sås ut på ny. Ettersom de fenotypiske testene gav samme resultat som ved første vurdering, ble stammene reanalysert på sanntids-PCR. Etter andre analysering ble *blaZ*-genet påvist i begge stammene.



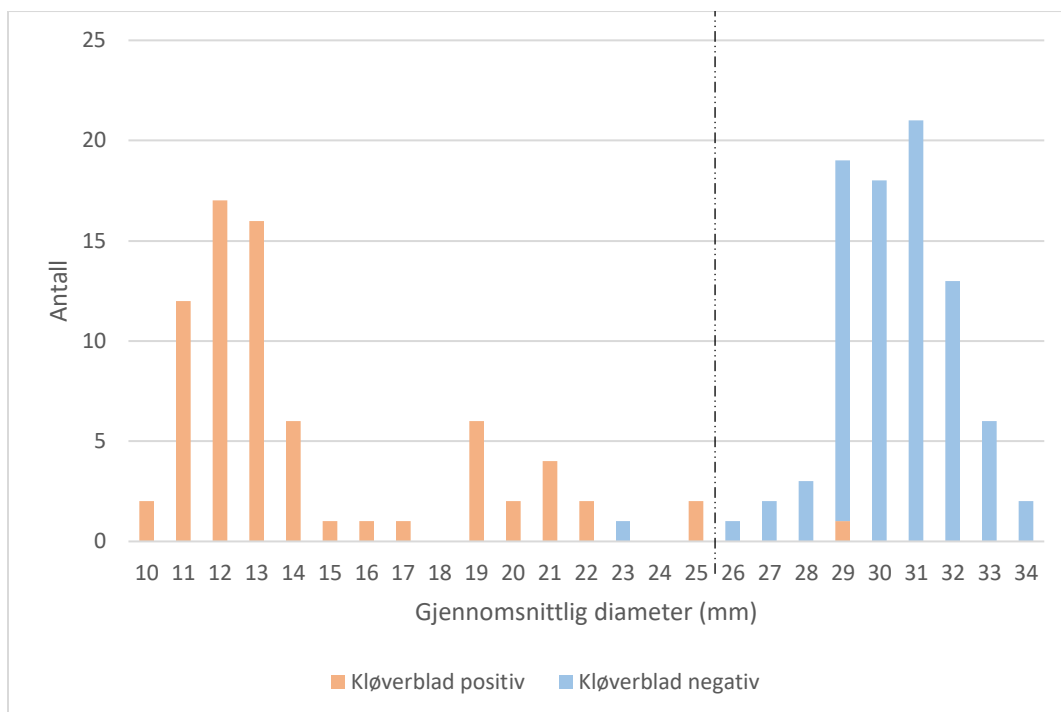
Figur 17. Forholdet mellom *blaZ*-negative og -positive stammer ved PCR. Andelen av stammer som enten er positive eller negative for det benzylpenicillinresistente genet *blaZ*. Den blå delen er andel positive stammer med påvist *blaZ*-gen, og den oransje er andel negative stammer.

Figur 17 viser forholdet mellom bakterieprøver med påvist *blaZ*-gen (46,2 %) og bakterieprøver uten påvist *blaZ*-gen (54,8 %).

4.4 Sammenligning av metoder

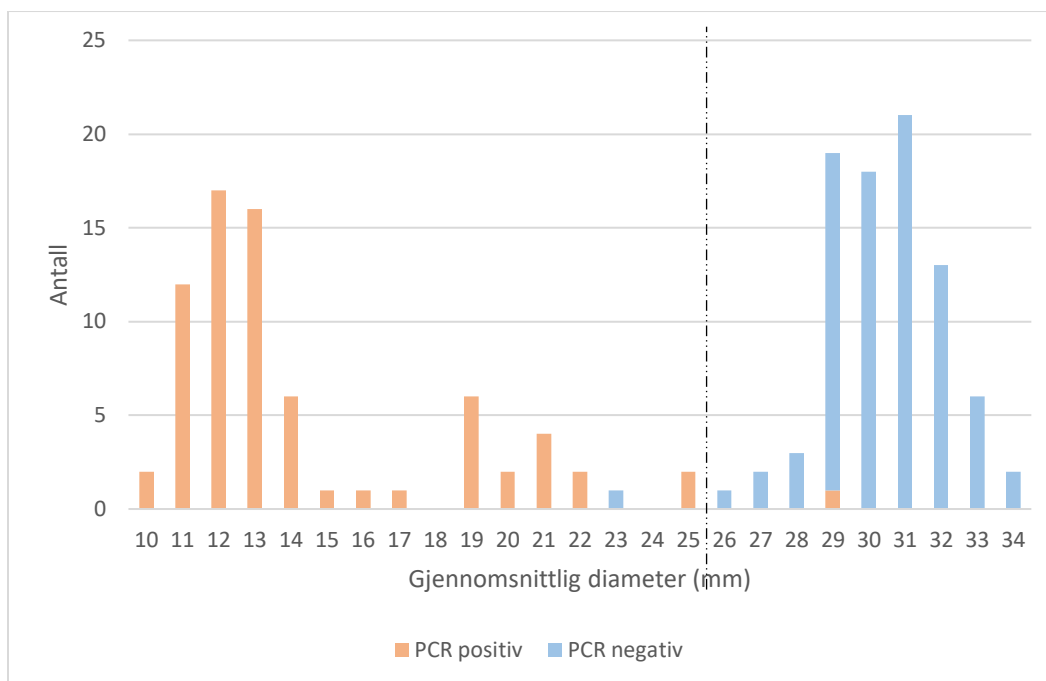
Da de fenotypiske metodene ble utført, ble disse to metodene sammenlignet. Dette sees i Figur 18. Etter at resultatene fra sanntids-PCR-analysen ble fremstilt, ble disse sammenlignet med resultatene fra kløverblad og lappediffusjon. Teoretisk sett skulle de som var 26 mm eller over ved lappediffusjon vært negative på sanntids-PCR, og de under 26 mm vært positive. Figur 19 viser hvordan dette forholdet ble for resultatene fra studien.

Kløverbladtesten viste seg å ha fullt samsvar med PCR-resultatene, og det er derfor ikke presentert en egen figur for sammenligning av disse metodene i dette avsnittet.



Figur 18. Kløverblad resultat mot lappediffusjon. x-aksen er diameteren i mm til bakteriestammene ved lappediffusjon og y-aksen er antall bakteriestammer. De oransje stolpene representerer de stammene som var positive ved kløverbladtest, og de blå stolpene viser til de stammene som var negative ved kløverbladtest. Den stiplede linjen representerer det kliniske bryningspunktet.

Figur 18 illustrerer forholdet mellom målte diameter i mm ved lappediffusjon og positiv/negativ kløverbladtest for alle bakterieprøvene. Ut ifra figuren kan det sees at det er en prøve målt til 23 mm på lappediffusjon som gav negativt resultat for resistens på kløverblad, og en prøve målt til 29 mm på lappediffusjon som gav positivt resultat på kløverbladtest.



Figur 19. PCR resultater mot lappediffusjon. x-aksen er diameteren i mm til bakteriestammene ved lappediffusjon og y-aksen antall bakteriestammer. De blå stolpene representerer de stammene som var negative for *blaZ*-genet og de oransje stolpene viser til de positive for *blaZ*-genet ved sanntids-PCR. Den stiplede linjen representerer det kliniske brytningspunktet.

Figur 19 viser fordelingen av positive og negative resultater på sanntids-PCR mot størrelsen på sonediameteren. Figuren illustrerer to normalfordelinger som hovedsakelig består av stammer positive og negative for *blaZ*, på henholdsvis venstre og høyre side. Fra denne figuren ser man også en stamme på 23 mm som var negativ ved sanntids-PCR og en på 29 mm som var positiv ved sanntids-PCR.

4.5 Statistiske sammenligninger

Etter at alle praktiske resultat var blitt fremlagt og vurdert, ble det utført statistiske beregninger for spesifisitet og sensitivitet. Dette ble gjort for å sammenligne metodene og for å kunne vurdere kvaliteten av metodene. Sanntids-PCR ble satt som gullstandard da denne metoden er automatisert og teoretisk sett mest pålitelig. Av den grunn ble resultater fra lappediffusjon og kløverbladtesten sammenlignet mot gullstandardens sanntids-PCR. I tillegg til sensitivitet og spesifisitet ble det beregnet positiv og negativ prediktiv verdi for metodene.

Tabell 8. Forholdet mellom antall resistente og følsomme stammer på lappediffusjon/kløverblad, sammenlignet med resistente og følsomme stammer på sanntids-PCR. En stamme ble vurdert falskt følsom, og en stamme falskt resistent ved lappediffusjon. Ellers stemmer resultatene for de følsomme og resistente stammene overens med hverandre. Forholdet mellom antall resistente og følsomme stammer på kløverbladtest er også sammenlignet med resistente og følsomme stammer på sanntids-PCR. Her stemmer alle resultatene overens med hverandre.

		Lappediffusjon			Kløverblad		
		Resistente	Følsomme	Sum	Resistente	Følsomme	Sum
PCR	Resistente	72	1	73	73	0	73
	Følsomme	1	84	85	0	85	85
	Sum	73	85		73	85	

Tabell 8 illustrerer forholdet mellom stammer vurdert som følsomme og resistente ved lappediffusjon, sammenlignet med de samme stammene analysert ved sanntids-PCR for *blaZ*-genet. Det samme gjelder for kløverbladtesten. Fra denne tabellen ser man at de stammene vurdert resistent/følsomme ved lappediffusjon og *blaZ*-positive/negative ikke stemmer overens. Fra disse testene ble 73 stammer vurdert resistente ved sanntids-PCR, mens én av disse ble avlest følsom ved lappediffusjon. For sanntids-PCR ble 85 stammer vurdert til følsomme, men én av disse ble avlest positiv ved lappediffusjon. For kløverbladtesten stemmer alle stammene vurdert betalaktamasepositive/negative med *blaZ*-positive/negative overens. Fra disse to testene ble 73 stammer da vurdert resistente og 85 stammer vurdert følsomme for benzylpenicillin.

Tabell 9. Oversikt over antall sanne resistente og sanne følsomme, og antall falske resistente og falske følsomme, i sammenligning av sanntids-PCR og lappediffusjon/kløverblad. Sanne resistente er antall stammer som ble vurdert som resistente på både sanntids-PCR og lappediffusjon/kløverblad. Falske resistente er antall stammer som ble vurdert som resistente på lappediffusjon/kløverblad, men var negative på sanntids-PCR. Sanne følsomme er stammer som ble vurdert følsomme for begge metoder, mens falske følsomme er stammer som ble vurdert følsom på lappediffusjon/kløverblad, men positiv på sanntids-PCR.

PCR + lappediffusjon		PCR + kløverblad	
Sanne resistente	72	Sanne resistente	73
Sanne følsomme	84	Sanne følsomme	85
Falske resistente	1	Falske resistente	0
Falske følsomme	1	Falske følsomme	0

Videre ser man på Tabell 9 som fremstiller kløverblad- og lappediffusjons-resultatene, og understreker de sanne resistente/følsomme mot de falske resistente/følsomme med sanntids-PCR brukt som gullstandard. Lappediffusjon gav 72 sanne resistente og én falskt resistant, og 84 sanne følsomme og én falskt følsom. Kløverbladtesten gav 73 sanne resistente svar og 85 sanne følsomme svar når sammenlignet med gullstandard.

Tabell 10. Beregnet sensitivitet og spesifisitet for metodene lappediffusjon og kløverbladtest, inkludert beregnet positiv og negativ prediktiv verdi.

Lappediffusjon		Kløverblad	
Sensitivitet	98.6 %	Sensitivitet	100 %
Spesifisitet	98.8 %	Spesifisitet	100 %
Positiv prediktiv verdi	98,6 %	Positiv prediktiv verdi	100 %
Negativ prediktiv verdi	98,8 %	Negativ prediktiv verdi	100 %

Tabell 10 viser til 98,6 % for sensitivitet og 98,8 % for spesifisitet ved bruk av den fenotypiske metoden lappediffusjon. For kløverbladmetoden ble både sensitivitet og spesifisitet beregnet til 100 %. De samme verdiene beregnet for sensitivitet og spesifisitet, ses også for positiv og negativ prediktiv verdi for begge metodene. For lappediffusjon ble positiv prediktiv verdi beregnet til 0,986, som tilsvarer 98,6 %, mens den negative prediktive verdien ble beregnet til 0,988, som tilsvarer 98,8 %. For kløverblad ble begge verdiene beregnet til 1, altså 100 %.

5. Diskusjon

Målet med denne studien var å gjennomføre en sammenligning av fenotypiske tester mot genotypisk metode, for å undersøke pålitelighet og kvalitet til de rutinemessige metodene for resistensbestemmelse ved Haukeland Universitetssykehus, lappediffusjon og kløverbladtest. For å vurdere kvalitet ble det derfor gjennomført resistensbestemmelse på 158 *S. aureus* stammer ved hjelp av lappediffusjon, kløverblad og PCR, før det deretter ble beregnet sensitivitet og spesifisitet for metodene. Gjennom studien har det kontinuerlig blitt gjort vurderinger av både skåler, kontroller og metodene generelt. Dette ble gjort for å sikre kvaliteten av resultatene. Etter hvert som metodene gav resultater ble de sammenlignet underveis, og det ble gjort vurderinger for om det var grunnlag for retesting av enkelte stammer. Dette grunnlaget kunne f.eks. være kontaminasjon, utfordrende tolkning av lappediffusjon, eller andre mulige feilkilder. For de tre manuelle parallellene fra målingen av sonediameter på lappediffusjon ble det beregnet prosentavvik for å se om det var stor variasjon i målingene. BIOMIC-målingene ble også sammenlignet med egne manuelle målinger for å undersøke om det var variasjon, ettersom BIOMIC er den metoden som benyttes i rutine ved Haukeland Universitetssykehus. Resultatene fra de fenotypiske metodene ble sammenlignet med hverandre og med resultatene fra sanntids-PCR. Alt ble utført med bakgrunn for om sanntids-PCR burde bli innført som rutine for resistensbestemmelse av *S. aureus*.

5.1 Kontroll og kvalitet

Ved lappediffusjon ble den positive kontrollstammen godkjent for hvert oppsett, da den holdt seg stabilt rundt en målverdi på 15 mm og mellom kontrollgrensen 12-18 mm. Godkjente kontroller betyr at ingen betydelige systematiske feil har oppstått. For kløverbladtesten og PCR ble også kontrollene godkjent, da den positive og den negative kontrollen gav forventet resultat, og blankprøven ble vurdert som negativ. Kvaliteten på blodskålene var god, men med varierende fortykning av bakterier. Alle skålene hadde dermed ikke like mange enkeltkolonier, men veksten var brukbar da det ble jobbet med renkulturer og det ikke var nødvendig med enkeltkolonier for de videre metodene. Ved lappediffusjon ble det observert en prøve hvor sonen hadde oval fasong og dermed dårlig kvalitet. Det antas at dette kan skyldes en tilfeldig feil, som for eksempel at antibiotikalappen har flyttet på seg og dermed gav ujevn diffusjon av benzylpenicillin. Retesting av stammen gav en rund og målbar sone av bedre kvalitet. Korrekte og forventede verdier på kontroller, samt god kvalitet på resultater,

underbygger troverdigheten og kvaliteten av den utførte studien - resultatene kunne altså benyttes til vurdering av metodene.

5.2 Kontaminering

Underveis i arbeidet ble det oppdaget at et frysemedium var blitt kontaminert. Dette ble oppdaget ved at lappediffusjon av prøven ikke så ut som forventet da skålen hadde vekst innad den tydelige sonekanten, helt inn mot antibiotikalappen. Blodskålen med utsædet ble derfor funnet frem, og det var tydelig at det kunne være to forskjellige bakterier i skålen. I blodskålen befant det seg både små og store kolonier. De to ulike koloniene ble isolert på hver sin blodskål, og deretter analysert på MALDI-TOF. Her viste det seg at de små koloniene var fra en gram-negativ bakterie som hadde kontaminert skålen, mens den større var *S. aureus*. Benzylpenicillin påvirker ikke vekst av gram-negative bakterier. Av den grunn kunne den kontaminerende bakterien vokse inn mot antibiotikalappen. Etter MALDI-TOF analyse kunne den isolerte skålen med *S. aureus* brukes videre. Denne observasjonen tydeliggjør viktigheten av nøyaktig arbeid ved behandling av bakterier. Kontaminering av bakterieprøver eller bakteriekulturer kan medføre feilaktige vurderinger, som igjen påvirker valg og effektivitet av behandling.

5.3 Avlesning av fenotypiske tester

Ved vurdering av sonekant kunne det være utfordrende å se om kanten var skarp eller diffus. Noen stammer var tydelig diffuse, hvor vekst av kolonier medførte en ujevn og diffus sonekant, mens andre var mer utfordrende å skille fra skåler med skarp sonekant. Stammene med tydelig skarp sonekant var derimot mindre utfordrende å vurdere. Ved måling av sonediameter viste det seg å være mer krevende å måle prøver med diffus kant, ettersom det var utfordrende å vurdere hvor grensen lå, og derfor også hvor man skulle måle. Dette førte til høyere variasjon mellom parallellene. Selv om kløverbladtesten ofte var enklere å avlese enn lappediffusjon, var kløverbladene heller ikke alltid tydelige. Dette kan blant annet skyldes lav produksjon av betalaktamase. Både lappediffusjon og kløverblad er subjektive metoder som kan medføre utfordringer med tanke på avlesning og vurdering av resultat.

5.4 Prosentavvik

For de tre manuelle parallellene og den semi-automatiske parallellen (BIOMIC) fra lappediffusjon ble det beregnet prosentavvik. Grensen for prosentavvik for manuelle metoder

blir ofte satt til 10 %, så det er dette som tas utgangspunkt i. For fire av de fem stammene med prosentavvik over 10 %, var årsaken at sonediameteren var liten og ikke pga. stor variasjon i målingene. Prosentavviket for de fire stammene ble akkurat 10 %. Det var kun prøve 1-85 der variasjonen i målingene var stor, og førte til et prosentavvik på 20,8 %. Dette kan skyldes at sonekanten var svært diffus og så gjerne ut til å forandre seg etter hvordan lyset traff skålen. Totalt var det altså bare 0,6 % av målingene som hadde prosentavvik over akseptabelt nivå på 10 % grunnet større variasjon mellom parallellene.

5.5 Manuelle målinger mot BIOMIC

Ved måling av sonediameteren på lappediffusjon ble alle målingene avrundet til hele tall. Dette kan ha ført til ulike resultater på parallellene, ettersom en måling kan være midt imellom to hele tall. De korrigerte resultatene fra BIOMIC varierte noe med gjennomsnittet til de tre manuelle parallellene. Ved måling av stammene med skarp sonekant, stemte manuelle resultater godt overens med BIOMIC. Prøver med stor sone og diffus sonekant ble ofte målt til større enn det manuelle gjennomsnittet når sammenlignet med den korrigerte målingen på BIOMIC (Figur 14). 42 % av BIOMIC sine korrigerte målinger var høyere enn gjennomsnittet av de manuelle parallellene. Bare 4 % av målingene på BIOMIC var lavere enn de manuelle målingene, mens 54 % stemte overens. Totalt var det nesten aldri mer enn 1 mm i forskjell mellom det manuelle gjennomsnittet og det korrigerte resultatet på BIOMIC. Det var kun tre diffuse stammer som hadde 2 mm i forskjell mellom det manuelle gjennomsnittet og BIOMIC. For stamme 1-85, som nevnt var utfordrende å måle, var forskjellen 3 mm. Det kan være nyttig å være oppmerksom på at BIOMIC i mange tilfeller fører til høyere målinger enn avlesning med skyvelære. En tenkt konsekvens kan være at en resistensskål med sonediameter i grenseområdet 25 mm kan vurderes som følsom ved måling på BIOMIC, men som resistent ved måling med skyvelære (uavhengig av vurdering av sonekant og kløverbladtest).

5.6 Lappediffusjon og kløverblad

Fra Figur 10 og 11 ses det en uoverensstemmelse med 54,4 % og 45,6 % henholdsvis diffuse og skarpe sonekanter, og 53,8 % og 46,2 % for henholdsvis sonediameter målt over/lik 26 mm og under 26 mm. Dette illustreres også i Figur 12. Unntaket som forskyver statistikken er stamme 21-1-7, som ble målt til 23 mm i diameter og med diffus sonekant. Denne ble vurdert som resistent, selv om diffus sonekant er karakteristisk for sensitive stammer. I rutine ved

Mikrobiologisk avdeling ved Haukeland Universitetssykehus ble denne stammen målt til 26 mm som samsvarer med både diffus sonekant, negativ kløverbladtest og ikke detektert *blaZ*-gen ved PCR. Det at stammen ble målt til 23 mm kan eventuelt skyldes en tilfeldig feil i oppsett av lappediffusjon. Det vil også alltid være en variasjon i hvert lappediffusjon-oppsett, som kan føre til usikkerhet på noen millimeter. I Figur 13 vises en oversikt over sonediametre målt ved de forskjellige parallellene. Figuren viser hovedsakelig to normalfordelinger som kan representere de sensitive og resistente stammene. Det vises en liten venstreforskyvning i normalfordelingen til de stammene som kan antas resistente. Det er også noen målinger som oppstår mellom disse to normalfordelingene.

Kløverbladtesten kjøres parallelt med lappediffusjon, og fungerer i rutine på Haukeland Universitetssykehus som en ekstra bekreftelse for lappediffusjon dersom stammen vurderes som følsom eller resultatet er usikkert. Figur 15 presenterer at det ble funnet 53,8 % betalaktamasenegative stammer og 46,2 % betalaktamasepositive stammer. På Figur 10 ses en annen prosentfordeling (45,6 % og 54,4 %) av resistente og følsomme stammer ved vurdering av sonekant. Dette betyr at avlest sonekant ved lappediffusjon ikke er samsvarende med resultat ved kløverbladtesten, med to avvikende stammer. Hvis man bare ser på prosentdelen av betalaktamasenegative/positive ved kløverbladtesten (Figur 15) mot måling av sonediameter ved lappediffusjon (Figur 11), stemmer disse overens. Hvis man derimot ser på stolpediagrammet i Figur 18 ser man tydelig at det er to stammer som viser motstridende resultater. Årsaken til at Figur 11 og 15 viser til like prosentverdier, selv om det er to prøver som har gitt forskjellig resultat på kløverbladtesten og vurdering av sonediameter, er at de to prøvene har fått omvendt resultat. En prøve med positivt resultat på kløverblad, men med negativt på lappediffusjon (1-71), samt en prøve med negativt resultat på kløverblad, og positivt på lappediffusjon (21-1-7).

Stamme 1-71 ble målt til 29 mm i diameter med diffus sonekant, som tilsvarer en sensitiv stamme. Ved kløverbladtesten ble stammen vurdert som svakt positiv, som kan tyde på at stammen produserte svært lave mengder betalaktamase eller har induserbar betalaktamaseproduksjon. Her kunne det vært enkelt å anta kløverbladtesten som negativ hvis man ikke studerer veksten nøyaktig. Sanntids-PCR bekreftet også tilstedeværelsen av *blaZ*-genet for denne prøven. Den andre stammen som gav motstridende resultat var 21-1-7, da den

ble vurdert til negativ på kløverbladtest. Hadde denne dukket opp i rutine ville den antakeligvis bare blitt vurdert på lappediffusjon og antatt som resistent.

5.7 PCR mot fenotypisk

Ved sammenligning av de fenotypiske metodene med den genotypiske metoden (sanntids-PCR) ses det godt samsvar. Resultatene fra kløverbladtest og sanntids-PCR stemte overens ved testing av alle stammene, som vil si at kløverbladtesten måler opp med gullstandarden. Dette kan ses i Figur 15, som illustrerer andel betalaktamasepositive og -negative stammer fra kløverbladtesten, og Figur 17, som illustrerer *blaZ*-positive og -negative stammer fra PCR-resultatene - begge figurene viser til lik andel positive og negative stammer for metodene. Ved lappediffusjon derimot ble stamme 1-71 og 21-1-7 vurdert til det motsatte av sanntids-PCR-resultatene (Figur 19). Dette medførte at én stamme ble vurdert som falskt resistent og én stamme ble vurdert som falskt følsom (Tabell 9). Årsaken til dette kan skyldes at det er flere usikre momenter ved vurdering av lappediffusjon. Både diameteren i mm og sonekanten skal vurderes, noe som kan være mer utfordrende å vurdere enn resultatene ved kløverblad, hvor man kun ser på vekst. Konsekvensen av feilvurderingene på de fenotypiske testene i praksis kan være at en pasient får uegnet antibiotika. Stammen som ble vurdert som falskt positiv ville ikke fått alvorlige konsekvenser, da pasienten ville blitt behandlet med kloksacillin i stedet for benzylpenicillin. Det er mer alvorlig at en stamme blir vurdert falskt negativ, da benzylpenicillin ikke ville ha fungert til behandling av en pasient med infeksjon av resistente bakterier.

Beregning av sensitivitet og spesifisitet (Tabell 10) for både lappediffusjon og kløverbladtesten tok utgangspunkt i den genotypiske metoden sanntids-PCR, da denne er satt som gullstandard. Da kløverblad hadde 100 % korrelasjon med sanntids-PCR-resultatene, ble den beregnede sensitiviteten og spesifisiteten for metoden 100 %. Den beregnede sensitiviteten og spesifisiteten for lappediffusjon ble henholdsvis 98,6 % og 98,8 %. I tillegg til sensitivitet og spesifisitet ble det beregnet positiv og negativ prediktiv verdi for å vurdere andel faktisk korrekte prøvesvar, også sett i Tabell 10.

Resultatene fra denne studien viser altså at kløverbladtesten har både høyere sensitivitet og spesifisitet enn lappediffusjon. Lappediffusjon har fremdeles en høy beregnet sensitivitet og spesifisitet, og kan ut fra denne studiens resultater anses som en tilstrekkelig og pålitelig

metode for resistensbestemmelse. Høye beregnede verdier for positiv og negativ prediktiv verdi for begge metodene underbygger i tillegg denne vurderingen. Kløverbladtesten er altså ut fra denne studiens resultat og beregninger en god metode for å kontrollere resultater fra lappediffusjon.

5.8 Sammenligning med forskningslitteratur

Det ble ikke funnet like mange forskningsartikler som omhandlet kløverbladtesting, i forhold til lappediffusjon. Ut ifra forskningsartiklene omtalt i Introduksjon var det bare forskning fra Takayama et al. (4) og Kaase et al. (5) som har gjort statistiske beregninger på begge metodene. I motsetning til denne studien, hvor P1 antibiotikalapper ble anvendt, benyttet Takayama et al. og Kaase et al. P10 antibiotikalapper. Takayama et al. beregnet sensitiviteten til 50 % og spesifisitet til 100 % for lappediffusjon, mens Kaase et al. beregnet sensitiviteten til 71,4 %. Begge studiene har beregnet betraktelig lavere verdier enn de beregnet fra resultatene presentert i denne studien. Årsaken til dette kan være at Takayama et al. og Kaase et al. har brukt andre konsentrasjoner av penicillin, i tillegg til at det kliniske brytningspunktet var satt til 28 mm, og ikke 26 mm som ble benyttet i denne studien. For kløverbladtesten viste Takayama et al. til sensitivitet på 50 % og spesifisitet på 100 %, mens for Kaase et al. hadde metoden en beregnet sensitivitet på 67,8 %. Kaase et al. presenterte ikke beregnet spesifisitet for noen av metodene. Ut ifra vår studie ser man at det er beregnet betydelig høyere sensitivitet og spesifisitet enn både Takayama et al. og Kaase et al. for begge metodene. Takayama et al. sin forskning inneholdt bare 1 % *blaZ*-positive stammer som kan ha forårsaket de lave verdiene. Annen forskning, fra Russi et al. (7) og Papanicolas et al. (6), har derimot beregnet høyere sensitivitet for lappediffusjon til henholdsvis 93 % og 100 %. Russi et al. har i tillegg beregnet spesifisitet på 97,4 %. Russi et al. og Papanicolas et al. viser en større korrelasjon til resultatene fra denne studien, enn studiene fra Takayama et al. og Kaase et al. Forskningslitteraturen viser altså til forskjellige resultater, hvor noen underbygger våre resultater, mens andre er motstridende. Ingen av de nevnte artiklene over hadde en identisk studie som vår, da det var forskjeller i antibiotikakonsentrasjon, klinisk brytningspunkt og prevalens av *blaZ*-genet blant prøvene.

5.9 Feilkilder

Selv om kløverbladtesten og lappediffusjon i denne studien viste til høy spesifisitet og sensitivitet, kan det likevel være noen fordeler ved å innføre rutiner for *blaZ*-deteksjon ved

sanntids-PCR. Bruk av sanntids-PCR kan eliminere en rekke manuelle feilkilder som kan påvirke resultatet ved vurdering av lappediffusjon og kløverblad - øyemål, lys, vurderingsevne, nøyaktighet, dagsform til vedkommende som vurderer og måler mfl. Da dette er manuelle metoder er det også feilkilder knyttet til oppslemming, utsåing og oppsett av resistensskåler. I tillegg til at sanntids-PCR er en automatisk metode med generelt færre eventuelle feilkilder, kan det også være en nyttig og effektiv metode ved tidsnød.

Kløverbladtesten må inkubere i 16-20 timer før den kan avleses, mens resultater fra sanntids-PCR kan hentes ut og observeres etter ca. 1 time. Feil hos de manuelle metodene kan derimot være lettere å fange opp ettersom de kan komme tydelig frem, mens for den automatiske metoden kan det være vanskeligere å oppdage hvor i prosessen feilen har oppstått. For de manuelle metodene var det derfor lettere å fange opp feil på de enkelte testene av hver enkelt stamme, mens for sanntids-PCR, som er en automatisk metode hvor flere prøver analyseres samtidig, var det vanskeligere å vurdere hvilke stammer som kan ha fått feil resultat.

Som omtalt i Resultat, ble det etter PCR-analyse observert at stamme 1-58 og 1-82 gav ulikt resultat i forhold til de fenotypiske metodene. Etter retesting samsvarte resultatene for både PCR og de fenotypiske metodene. Denne forskjellen skyldes antakelig en tilfeldig feil ved første oppsett. Det kan derfor ikke utelukkes at denne feilen kan ha gjentatt seg. Følgene av dette vil være at flere stammer skulle ha blitt positive for *blaZ*-genet på sanntids-PCR, enn det antallet som er representert her.

6. Konklusjon

S. aureus er en klinisk relevant bakterie med stor utbredelse blant både mennesker og dyr. Resistensutvikling blant denne bakteriearten har blitt en global utfordring, da dette medfører problematikk ved antibiotikabehandling. Feilvurdering av bakteriens resistensmekanisme kan medføre at antibiotikabehandlingen ikke fungerer, og det vil ta lengre tid for pasienten å bli frisk. Målet med denne studien var derfor å sammenligne de fenotypiske metodene lappediffusjon og kløverbladtest mot den genotypiske metoden PCR, for å undersøke om PCR burde innføres som rutine for resistensbestemmelse av *S. aureus* for sikker diagnostisering. Tidligere forskning har brukt ulike teknikker og prinsipper, og dette har gitt varierende resultater. Resultatene fra denne studien er relativt gode for de fenotypiske metodene, sammenlignet med de andre studiene.

Kløverbladtest- og PCR-resultatene stemte overens for alle de 158 stammene. Sensitiviteten og spesifisiteten for kløverblad ble beregnet til 100 %, som underbygger metodens kredibilitet. Etersom sensitivitet og spesifisitet for lappediffusjon ble tilnærmet 99 %, tyder dette på at også denne metoden er pålitelig og kan benyttes til resistensbestemmelse. Dersom et lappediffusjons-resultat er vanskelig å vurdere, eller er på grensen mellom resistent eller følsom, skal det være tilstrekkelig å utføre kløverbladtest ettersom denne ifølge studiens resultater skal gi samme svar som en sanntids-PCR-analyse. De fenotypiske metodene er billigere og mindre ressurskrevende enn sanntids-PCR-analysen, og derfor vil disse være å foretrekke.

Ifølge studiens resultater vil ikke sanntids-PCR være kritisk å innføre som tilleggsanalyse eller overta for de fenotypiske testene, ettersom kløverbladtesten viste seg å ha 100 % korrelasjon med PCR. Derimot kan det vurderes å innføre PCR-metoden for å imøtekomme mottoet til Mikrobiologisk avdeling "raske relevante resultater." Da oppsett av kløverbladtest vil ta en hel ekstra dag, kan det vurderes å kjøre *blaZ*-analyse på hastepøver. Dette vil medføre raskere svar og større andel behandling rettet mot bruken av smalspektret antibiotikum.

7. Referanser

1. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. 2005 [hentet 10.03.21; 5(12):[751-62 s.]. Tilgjengelig fra: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(05\)70295-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(05)70295-4/fulltext).
2. Schøyen R. Mikroorganismer og sykdom : lærebok i mikrobiologi og infeksjonssykdommer for helsepersonell. 9. utg. Oslo: Gyldendal akademisk; 2011. 496 s.
3. Folkehelseinstituttet. Stafylokokkinfeksjoner (inkl. MRSA-infeksjoner) - veileder for helsepersonell [Internett]. Oslo:2010 [oppdatert 23.08.2019; hentet 09.03 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/stafylokokkinfeksjoner-inkl.-mrsa-i/>.
4. Takayama Y, Tanaka T, Oikawa K, Funkao N, Goto M, Takahashi T. Prevalence of *blaZ* Gene and Performance of Phenotypic Tests to detect Penicillinase in *Staphylococcus aureus* Isolates from Japan.2018 [hentet 10.03 2021]; 38(2):[155-9 s.]. Tilgjengelig fra: <https://www.annlabmed.org/journal/view.html?volume=38&number=2&spage=155>.
5. Kaase M, Lenga S, Friedrich S, Szabados F, Sakinc D, Kleine B, et al. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus Aureus*.2008 [hentet 10.03 2021]; 14(6):[614-6 s.]. Tilgjengelig fra: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61962-5/fulltext#articleInformation](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61962-5/fulltext#articleInformation).
6. Papanicolas LE, Bell JM, Bastian I. Performance of Phenotypic Tests for Detection of Penicillinase in *Staphylococcus aureus* Isolates from Australia. [Internett]. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2014 [oppdatert 22.01.2014; hentet 10.03 2021]. Tilgjengelig fra: <https://jcm.asm.org/content/52/4/1136>.
7. Russi NB, Maito J, Dieser SA, Renna MS, Signorini ML, Camussone C, et al. Comparison of phenotypic tests for detecting penicillin G resistance with presence of *blaZ* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections. Journal of Dairy Research. 2015;82(3):317-21.
8. Aree A, Edgeworth JD. Carriage, Clinical Microbiology and Transmission of *Staphylococcus aureus*. . 2016. *Staphylococcus aureus* [elektronisk bok]. Trento: Springer, Cham, [hentet 10.03.2021]; [1-19]. Tilgjengelig fra: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-72063-0.pdf>.
9. Baddour M. MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) Infections and Treatment [Internett]. New York: Nova Science Publishers; 2010 [hentet 10.03 2021]. Tilgjengelig fra: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/hogskbergen-ebooks/detail.action?docID=3020440&pq-origsite=primo>.
10. Eye of Science. *Staphylococcus aureus* bacteria. Science Photo Library. Hentet fra <https://www.sciencephoto.com/media/12864/view/staphylococcus-aureus-bacteria>.
11. Bokarewa MI, Jin T, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. 2006. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology [elektronisk bok]. Elsevier B. V., [hentet 10.03.2021]; [504-9]. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1357272505002098?via%3Dihub>.

12. Brown K. Alexander Fleming [Internett]. London: Britannica, Inc.; 1999 [oppdatert 07.03.2021; hentet 10.03 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.britannica.com/biography/Alexander-Fleming>.
13. Lund B. Antibiotika. Aktuell Nordisk Odontologi. 2017[hentet 10.03.2021]; 42(1):60-75. Tilgjengelig fra: https://www.idunn.no/aktuel_nordisk_odontologi/2017/01/antibiotika.
14. Granlund S. Antibiotika og virkningsmekanismer. Trondheim: St. Olavs Hospital.
15. Berild D, Frimodt-Møller N. Antibiotikas virkningsmekanisme og angrepspunkter på en bakterie. Tazocin Wyeth Lederle; 2004.
16. Legemiddelhandbok N. Kloksacillin, dikloksacillin, flukloksacillin. [Internett]. Norsk Legemiddelhandbok; 2016 [oppdatert 28.09.2018; hentet 12.03 2021]. Tilgjengelig fra: https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.2.1/Kloksacillin,_dikloksacillin,_flukloksacillin.
17. Haaber J, Penadés JR, Ingmer H. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. 2017 [hentet 12.03 2021]; 25(11):[893-905 s.]. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0966842X17301257>.
18. Pereira LA, Harnett GB, Hodge MM, Cattell JA, Speers DJ. Real-Time PCR Assay for Detection of *blaZ* Genes in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. 2014 [hentet 10.03 2021]; 52(4):[1259-61 s.]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3993521/>.
19. Vesterholm-Nielsen M, Larsen MO, Olsen JE, Aarestrup FM. Occurrence of the *blaZ* gene in penicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark.1999 [hentet 10.03 2021]; 40(3):[279-86 s.]. Tilgjengelig fra: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10605145/>.
20. Zscheck KK, Murray EB. Genes involved in the regulation of beta-lactamase production in enterococci and staphylococci.1993 [hentet 10.03 2021]; 37(9):[1966-70 s.]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC188101/#reference-sec>.
21. Åhman J, Matuschek E, Kahlmeter G. EUCAST evaluation of 21 brands of Mueller-Hinton dehydrated media for disc diffusion testing. 2020 [hentet 16.03 2021]; 26(10). Tilgjengelig fra: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Publications/CMI_1905.pdf.
22. EUCAST. Antimicrobial susceptibility testing. EUCAST disk diffusion method. EUCAST2021. Tilgjengelig fra: <https://eucast.org/>
23. NordicAST. NordicASTs breakpoint tables: NordicAST; 2021 [Tilgjengelig fra: <http://www.nordicast.org/brytpunktstabeller>].
24. Skaare D, Giske CG, Justesen US. Påvisning av betalaktamase hos *Staphylococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* og *Neisseria meningitidis*. [Internett]. Nordic Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2013 [oppdatert 20.03.2015; hentet 10.03 2021]. Tilgjengelig fra: http://www.nordicast.org/d/2560?store_referer=true.
25. Helse Bergen. Kløverbladmetoden for påvisning av betalaktamaser. 6.0. utg. 2020.

26. Hou T-Y, Chiang-Ni C, Teng S-H. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2019;27(2):404-14.
27. Institutt for biovitenskap. PCR - Polymerase kjedereaksjon [Internett]. Oslo: Universitetet i Oslo; 2011 [oppdatert 21.12.2020; hentet 10.03 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html>.
28. INC. TB. Premix Ex Taq (Perfect Real Time).
29. Lydersen S. Hva er sannsynligheten for riktig resultat av en diagnostisk test?. [Internett]. Oslo: Tidsskriftet: Den norske legeforeningen; 2017 [oppdatert 03.10.2017; hentet 10.03 2021]. 18:[Tilgjengelig fra: <https://tidsskriftet.no/2017/10/medisin-og-tall/hva-er-sannsynligheten-riktig-resultat-av-en-diagnostisk-test>

8. Appendix

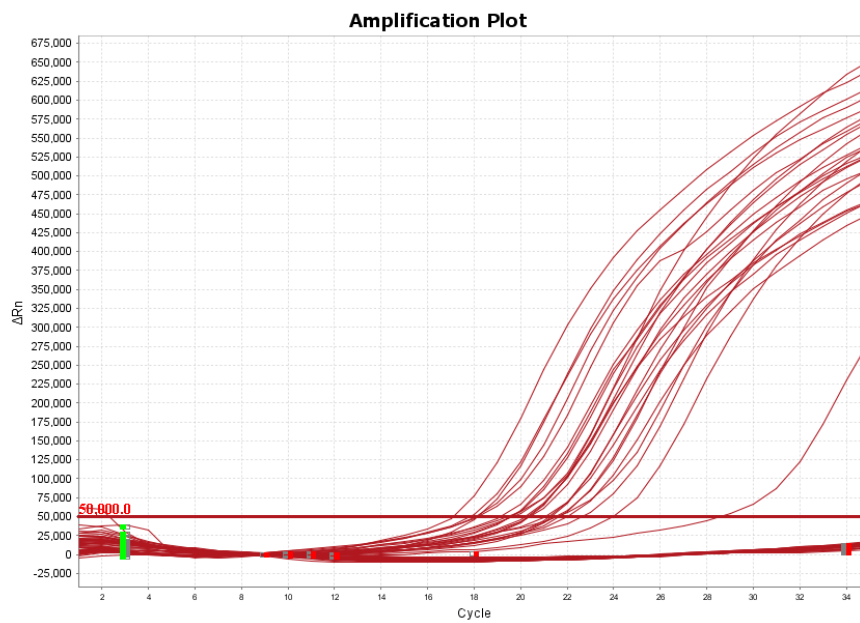
Vedlegg 1: Metodebeskrivelse ved bruk av BIOMIC.

For å analysere MH-skåler på BIOMIC velges først “Test” øverst til venstre i bildet og deretter “Rapid batch test”. *Staphylococcus aureus* velges som organisme, og “Studentprosjekt” som Drug Panel. Under “Specimen nummer” noteres prøvenummer på alle skåler som skal analyseres, før en trykke på “OK”. Deretter velges “Testing center” i hovedmenyen og “Batch Specimen”. Under “Initial” skrives initialene til den som analyserer platen. Prøven som ønskes analysert markeres ved å trykke på prøvenummeret i listen. Når dette er gjort kan skålen plasseres i analyseskuffen med sonen opp mot pilen på maskinen, og skyves inn i instrumentet. Eventuelt rusk eller støv tørkes bort med lofritt papir før skålen blir plassert i skuffen. “Read Plate” velges for å få frem bildet av skålen. Avlesningen gjøres ved å justere måleringen rundt sonekanten. Til slutt velges “Review results” for å lagre resultatet. Skuffen dras ut og skålen byttes ut med neste som skal analyseres. Nummeret på neste skål velges i listen, og samme prosedyre gjentas. For å lagre alle resultatene markeres nederste prøve i listen, høyreklikk og velg “select all above”, høyreklikk igjen og dermed “Move to past”. Fjern den nederste haken for “Transfer results to LIS” om denne er markert, og trykk “OK”.

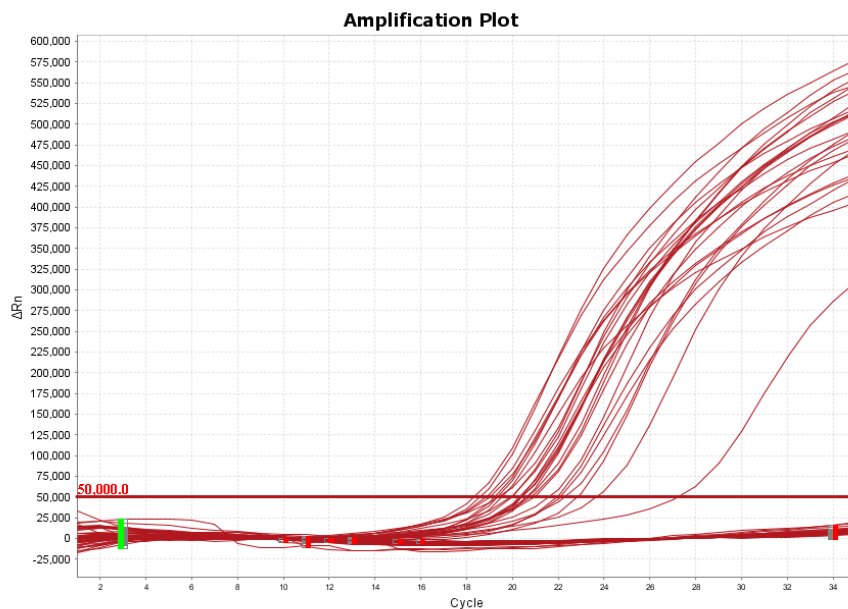
Supplementær tabell 1: Tillaging av PCR-mastermiks med reagenser for 1 prøve og 61 prøver.

Reagens	Til 1 prøve: Mengde (µL)	Til 61 prøver: Mengde (µL)
Premix Extaq HS (TaKaRa)	12,5	763
blaZ F2-primer (10 µM løsning)	1	61
blaZ R-primer (10 µM løsning)	1	61
blaZ-Pb	0,5	30,5
Vann (PCR-grade)	8	488

Supplementær figur 1 og 2: PCR-resultat for oppsett 2 og 3.



Figur 1. Resultater fra PCR-analysering av oppsett 2. x-aksen viser antall sykluser, mens y-aksen viser amplifisert mengde av gen *blaZ*. Dersom en stamme inneholder gen *blaZ* vil mengden *blaZ* øke ved antall sykluser, ettersom genet blir amplifisert, og det dannes en bøyd kurve. Dersom stammen ikke inneholder gen *blaZ* vil kurven være flat. Threshold verdi ble satt til 50 000 ΔRn . Oppsett 2 inneholdt prøve 1-54 til 2-6.



Figur 2. Resultater fra PCR-analysering av oppsett 3. x-aksen viser antall sykluser, mens y-aksen viser amplifisert mengde av gen *blaZ*. Dersom en stamme inneholder gen *blaZ* vil mengden *blaZ* øke ved antall sykluser, ettersom genet blir amplifisert, og det dannes en bøyd kurve. Dersom stammen ikke inneholder gen *blaZ* vil kurven være flat. Threshold verdi ble satt til 50 000 ΔRn . Oppsett 2 inneholdt prøve 2-7 til 21-1-7.

Supplementær tabell 2: Rådata.

Tabell 2: Resultater fra lappediffusjon (manuell og BIOMIC), kløverbladtesten og PCR-analyse.

Stamme	Lappediffusjon				Sonekant Skarp/diffus	Kløverblad- test Positiv/ negativ	BIOMIC		BlaZ PCR Positiv/ negativ
	Student 1	Student 2	Student 3	Gjennom snitt			Auto	Manuell	
Negativ kontroll 18/1/21						Negativ			
Positiv kontroll 18/1/21	16	16	16	16	Skarp	Positiv			
1-1	12	12	12	12	Skarp	Positiv	13	12	Positiv
1-2	19	19	19	19	Skarp	Positiv	19	19	Positiv
1-3	13	13	13	13	Skarp	Positiv	14	13	Positiv
1-4	18	17	17	17	Skarp	Positiv	17	17	Positiv
1-5	11	11	11	11	Skarp	Positiv	11	11	Positiv
1-6	31	30	31	31	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
1-7	34	34	34	34	Diffus dobbelsone	Negativ	30	35	Negativ
1-8	33	33	32	33	Diffus	Negativ	29	33	Negativ
1-9	32	32	32	32	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
1-10	32	32	31	32	Diffus, vanskelig å vurdere	Negativ	28	32	Negativ
Negativ kontroll 19/1/21						Negativ			
Positiv kontroll 19/1/21	16	16	16	16	Skarp	Positiv			
1-11	14	14	13	14	Skarp	Positiv	14	14	Positiv
1-12	15	14	14	14	Skarp	Positiv	14	14	Positiv
1-13	11	11	11	11	Skarp	Positiv	12	11	Positiv
1-14	11	11	11	11	Skarp	Positiv	11	11	Positiv
1-15	31	30	30	30	Diffus	Negativ	28	30	Negativ
1-16	31	30	30	30	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
1-17	12	12	11	12	Skarp	Positiv	12	12	Positiv

1-18	21	20	20	20	Skarp	Positiv	21	21	Positiv
1-19	14	13	14	14	Skarp	Positiv	14	14	Positiv
1-20	13	12	12	12	Skarp	Positiv	12	12	Positiv
Negativ kontroll 20/1/21						Negativ			
Positiv kontroll 20/1/21	16	16	16	16	Skarp	(Positiv)			
1-21	32	31	31	31	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
1-22	32	32	32	32	Diffus	Negativ	29	32	Negativ
1-23	21	20	21	21	Skarp	Positiv	22	21	Positiv
1-24	13	14	14	14	Skarp	Positiv	14	14	Positiv
1-25	29	30	29	29	Diffus	Negativ	27	28	Negativ
1-26	22	22	22	22	Skarp	Positiv	22	22	Positiv
1-27	22	22	22	22	Skarp	Positiv	22	22	Positiv
1-28	13	13	13	13	Skarp	Positiv	13	13	Positiv
1-29	31	30	30	30	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
1-30	31	30	31	31	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
1-31	29	30	30	30	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
1-32	13	12	13	13	Skarp	Positiv	13	13	Positiv
1-33	29	29	29	29	Diffus	Negativ	26	30	Negativ
1-34	32	31	31	31	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
1-35	21	20	21	21	Skarp	Positiv	21	21	Positiv
1-36	31	30	31	31	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
1-37	31	31	31	31	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
1-38	33	32	33	33	Diffus	Negativ	30	33	Negativ
1-39	33	32	32	32	Diffus	Negativ	29	33	Negativ
1-40	14	13	13	13	Skarp	Positiv	13	14	Positiv
1-41	31	31	30	31	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
1-42	33	33	33	33	Diffus	Negativ	30	33	Negativ
1-43	30	31	30	30	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
1-44	13	12	12	12	Skarp	Positiv	11	12	Positiv
1-45	11	11	11	11	Skarp	Positiv	11	11	Positiv
1-46	13	12	12	12	Skarp	Positiv	13	13	Positiv

1-47	13	12	13	13	Skarp	Positiv	13	13	Positiv
1-48	11	10	11	11	Skarp	Positiv	11	11	Positiv
1-49	32	32	33	32	Diffus dobbeltson e	Negativ	29	33	Negativ
1-50	31	32	31	31	Diffus dobbeltson e	Negativ	29	32	Negativ
Negativ kontroll 26.01.21						Negativ			
Positiv kontroll 26.01.21	17	17	18	17	Skarp	Positiv			
1-51	32	31	32	32	Diffus dobbeltson e	Negativ	29	33	Negativ
1-52	32	33	33	33	Diffus	Negativ	29	33	Negativ
1-53	32	32	32	32	Diffus	Negativ	29	34	Negativ
1-54	29	30	29	29	Diffus	Negativ	27	31	Negativ
1-55	31	30	30	30	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
1-56	21	21	21	21	Skarp	Positiv	22	21	Positiv
1-57	14	14	14	14	Skarp	Positiv	15	15	Positiv
1-58	13	13	14	13	Skarp	Positiv	14	14	Negativ
1-59	12	12	12	12	Skarp	Positiv	12	13	Positiv
1-60	21	21	21	21	Skarp	Positiv	22	22	Positiv
Negativ kontroll 27.01.21						Negativ			
Postiv kontroll 27.02.21	15	15	16	15	Skarp	Positiv			
1-61	33	33	32	33	Diffus	Negativ	29	33	Negativ
1-62	31	31	32	31	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
1-63	30	30	30	30	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
1-64	31	31	31	31	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
1-65	29	30	29	29	Diffus	Negativ	26	30	Negativ
1-66	29	29	29	29	Diffus	Negativ	26	29	Negativ
1-67	31	31	31	31	Diffus	Negativ	28	31	Negativ

1-68	12	12	13	12	Skarp	Positiv	13	12	Positiv
1-69	32	31	31	31	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
1-70	12	12	12	12	Skarp	Positiv	12	12	Positiv
1-71	29	29	29	29	Diffus	(Positiv)	27	29	Positiv
1-72	13	13	13	13	Skarp	Positiv	14	13	Positiv
1-73	13	12	13	13	Skarp	Positiv	12	13	Positiv
1-74	30	30	30	30	Diffus	Negativ	27	29	Negativ
1-75	12	12	13	12	Skarp	Positiv	13	12	Positiv
1-76	28	29	29	29	Diffus	Negativ	26	28	Negativ
1-77	12	12	13	12	Skarp	Positiv	12	12	Positiv
1-78	12	12	12	12	Skarp	Positiv	11	12	Positiv
1-79	11	11	11	11	Skarp	Positiv	12	11	Positiv
1-80	30	30	29	30	Diffus	Negativ	26	30	Negativ
Negativ kontroll 31.01.21						Negativ			
Positiv kontroll 31.01.21	15	15	15	15	Skarp	Positiv			
1-81	25	25	25	25	Skarp	Positiv	24	25	Positiv
1-82	25	24	25	25	Skarp	Positiv	23	24	Negativ
1-83	30	30	31	30	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
1-84	30	30	31	30	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
1-85	24 vanskelig å lese	28	26	26	Diffus	Negativ	26	29	Negativ
1-86	10	10	10	10	Skarp	Positiv	10	10	Positiv
1-87	11	11	11	11	Skarp	Positiv	11	11	Positiv
1-88	28	28	29	28	Diffus	Negativ	28	29	Negativ
1-89	31	32	31	31	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
1-90	29	29	29	29	Diffus	Negativ	26	29	Negativ
1-91	31	31	31	31	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
1-92	12	12	12	12	Skarp	Positiv	11	12	Positiv
1-93	20	20	20	20	Skarp	Positiv	21	20	Positiv
1-94	29	29	29	29	Diffus	Negativ	27	30	Negativ

1-95	30	30	31	30	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
1-96	30	29	30	30	Diffus	Negativ	28	30	Negativ
1-97	12	12	12	12	Skarp	Positiv	12	12	Positiv
1-98	28	28	28	28	Diffus	Negativ	26	29	Negativ
1-99	29	29	29	29	Diffus	Negativ	27	30	Negativ
1-100	33	33	33	33	Diffus	Negativ	30	34	Negativ
Negativ kontroll 1.2.21						Negativ			
Positiv kontroll 1.2.21	16	16	16	16	Skarp	Positiv			
2-1	32	32	32	32	Diffus	Negativ	29	32	Negativ
2-2	29	30	29	29	Diffus	Negativ	26	30	Negativ
2-3	30	31	31	31	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
2-4	19	19	20	19	Skarp	Positiv	20	20	Positiv
2-5	19	19	19	19	Skarp	Positiv	20	19	Positiv
2-6	19	18	19	19	Skarp	Positiv	20	19	Positiv
2-7	13	13	14	13	Skarp	Positiv	12	14	Positiv
2-8	19	19	19	19	Skarp	Positiv	18	19	Positiv
2-9	11	11	12	11	Skarp	Positiv	11	12	Positiv
2-10	12	13	13	13	Skarp	Positiv	13	13	Positiv
Negativ kontroll 2.2.21						Negativ			
Positiv kontroll 2.2.21	16	15	16	16	Skarp	Positiv			
2-11	31	31	31	31	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
2-12	31	31	32	31	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
2-13	29	30	30	30	Diffus	Negativ	28	29	Negativ
2-14	11	10	11	11	Skarp	Positiv	11	11	Positiv
2-15	29	29	29	29	Diffus	Negativ*	26	28	Negativ
2-16	30	30	30	30	Diffus	Negativ	28	30	Negativ
2-17	12	12	13	12	Skarp	Positiv	13	13	Positiv
2-18	31	31	30	31	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
2-19	13	12	13	13	Skarp	Positiv	12	12	Positiv

2-20	10	11	11	11	Skarp	Positiv	11	11	Positiv
2-21	11	11	12	11	Skarp	Positiv	12	12	Positiv
2-22	29	29	30	29	Diffus	Negativ	28	29	Negativ
2-23	13	12	13	13	Skarp	Positiv	13	13	Positiv
2-24	29	30	29	29	Diffus	Negativ	28	30	Negativ
2-25	31	31	31	31	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
2-26	31	31	31	31	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
2-27	31	31	31	31	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
2-28	29	29	29	29	Diffus	Negativ	27	29	Negativ
2-29	32	32	32	32	Diffus	Negativ	29	32	Negativ
2-30	30	29	30	30	Diffus	Negativ	27	30	Negativ
Negativ kontroll 03.02.21						Negativ			
Positiv kontroll 03.02.21	16	16	16	16	Skarp	Positiv			
2-31	13	13	14	13	Skarp	Positiv	13	14	Positiv
2-32	15	14	15	15	Skarp	Positiv	15	15	Positiv
2-33	32	32	32	32	Diffus	Negativ	28	33	Negativ
2-34	31	32	32	32	Diffus	Negativ	29	32	Negativ
2-35	13	12	13	13	Skarp	Positiv	13	13	Positiv
2-36	12	12	12	12	Skarp	Positiv	13	13	Positiv
2-37	16	16	16	16	Skarp	Positiv	17	16	Positiv
2-38	12	11	12	12	Skarp	Positiv	12	12	Positiv
2-39	31	30	30	30	Diffus	Negativ	28	31	Negativ
2-40	32	32	32	32	Diffus	Negativ	28	32	Negativ
2-41	32	32	32	32	Svak Diffus	Negativ	28	32	Negativ
2-42	29	29	30	29	Diffus	Negativ	27	30	Negativ
2-43	29	29	29	29	Diffus	Negativ	26	30	Negativ
2-44	12	12	13	12	Skarp	Positiv	13	13	Positiv
2-45	34	34	34	34	Diffus	Negativ	31	35	Negativ
2-46	10	10	10	10	Skarp	Positiv	10	11	Positiv
2-47	11	11	12	11	Skarp	Positiv	12	12	Positiv
2-48	30	30	30	30	Diffus	Negativ	28	31	Negativ

2-49	14	14	15	14	Skarp	Positiv	15	15	Positiv
2-50	13	13	13	13	Skarp	Positiv	14	14	Positiv
2-51	13	13	14	13	Skarp	Positiv	13	14	Positiv
Kontroll r fra 02.02.21									
21-1-1	29	29	29	29	Diffus	Negativ	26	29	Negativ
21-1-2	27	27	27	27	Diffus	Negativ	25	27	Negativ
21-1-3	27	27	27	27	Diffus	Negativ	26	27	Negativ
21-1-4	29	28	29	29	Diffus	Negativ	26	29	Negativ
21-1-5	19	19	19	19	Skarp	Positiv	19	20	Positiv
21-1-6	28	28	27	28	Diffus	Negativ	26	28	Negativ
21-1-7	23	24	23	23	Diffus	Negativ	23	24	Negativ